

QR
1
A475
V.13
1899
PER

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

(JOURNAL DE MICROBIOLOGIE)

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES

PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT

PROFESSEUR A LA SORBONNE

DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

Assisté d'un Comité de rédaction composé de

MM. D^r CALMETTE (A.), directeur de l'Institut Pasteur de Lille.

CHAMBERLAND, chef de service à l'Institut Pasteur.

D^r GRANCHER, professeur à la Faculté de médecine;

METCHNIKOFF, chef de service à l'Institut Pasteur;

NOCARD, professeur à l'École vétérinaire d'Alfort;

D^r ROUX, sous-directeur de l'Institut Pasteur;

D^r VAILLARD, professeur au Val-de-Grâce.

TOME TREIZIÈME

1899

AVEC NEUF PLANCHES

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LES MALADIES DES PLANTES PAR M. EMILE LAURENT

Il serait évidemment souhaitable d'avoir, au sujet des maladies parasitaires des végétaux, des renseignements du même ordre que ceux que nous possédons au sujet des maladies de l'homme et des animaux : on verrait probablement reparaître, sur ce terrain nouveau de la lutte entre espèces végétales, les mêmes forces physico-chimiques que la physiologie animale nous montre en action. Malheureusement, jusqu'ici, les botanistes ont peu étudié les questions relatives à la virulence des parasites, à leurs procédés d'attaque des tissus vivants, aux moyens de défense des végétaux, aux toxines, aux antitoxines, aux vaccins.

Pourtant, on pouvait attendre beaucoup de recherches expérimentales entreprises sur le parasitisme chez les végétaux, dont l'alimentation peut être gouvernée avec beaucoup plus de précision que celle des animaux. Ils se laissent facilement soumettre à des essais variés, et, chez certaines espèces qui se perpétuent par voie asexuelle, on n'a pas à redouter les effets de la variation individuelle.

Ce n'est pas tout. Tout un groupe de questions, moins faciles à aborder dans l'étude des maladies animales, pouvaient

être élucidées par des recherches sur les parasites des plantes. Ce sont celles qui sont relatives aux relations entre la vie saprophyte et la vie parasite de beaucoup de champignons. Telles espèces, le *Botrytis cinerea* (*Peziza Fuckeliana*) en est un exemple excellent, vivent aux dépens des végétaux morts. Mais, dans certaines circonstances, on les voit devenir réellement parasites et provoquer de véritables épidémies parmi les plantes sauvages, et plus fréquemment encore parmi les plantes cultivées.

Ce sont là de beaux exemples de développement de la virulence, dont l'analyse paraît, *a priori*, plus simple que chez les parasites des animaux.

Voilà une série de questions que je m'étais proposé depuis longtemps d'aborder à l'aide d'expériences sur des plantes.

La plupart des maladies qui attaquent les végétaux supérieurs sont causées par des champignons dont le développement est relativement lent. Ils conviennent peu pour ce genre de recherches. Après divers essais tentés avec des moisissures diverses, je me suis décidé à utiliser deux bacilles qui s'étaient développés accidentellement sur des tubercules placés en atmosphère humide. Ils sont devenus rapidement des parasites virulents, qui convenaient à merveille aux recherches que j'avais en vue.

I

L'idée que la nature de l'alimentation donnée aux plantes influe sur leur résistance aux parasites n'est pas nouvelle.

Dès 1863, Liebig, dans un discours prononcé à l'Académie des Sciences de Munich, faisait remarquer que des pommes de terre, qui avaient été cultivées dans un champ où l'on avait répandu du phosphate de chaux et des sels de potasse, résistaient complètement à la maladie, tandis que des pommes de terre cultivées dans un sol fumé avec du terreau, et dans un autre avec du sulfate d'ammoniaque, furent la proie de la maladie.

Georges Ville a dû faire des observations analogues, car dans ses cours il insistait sur le rôle préservatif des sels de potasse contre les maladies de la vigne, particulièrement contre l'oïdium.

C'est un fait bien connu des agriculteurs qu'un excès d'engrais azotés favorise le développement de la rouille des céréales et du *Phytophthora* de la pomme de terre.

Ces relations entre l'alimentation minérale des plantes et l'intensité de leurs maladies cryptogamiques ont dû paraître peu compréhensibles aussi longtemps que la pathologie générale a été dominée par le rôle spécifique des parasites, et que l'on ignorait la notion de la variation de la virulence.

J'avais autrefois attiré l'attention sur les rapports qui paraissent exister entre la dispersion du Gui sur une même espèce d'arbre (peuplier, pommier) et la nature du sol¹. En Belgique, ce parasite n'existe pas dans la zone sablonneuse septentrionale, mais est assez fréquent dans la région méridionale, là où le calcaire est beaucoup plus répandu. Des faits du même ordre se remarquent pour d'autres plantes parasites vasculaires (*Cuscuta*, *Orobanches*). Il semble donc légitime de supposer que la nature du sol, c'est-à-dire l'alimentation minérale, exerce une influence indirecte sur le développement des parasites vasculaires.

De nombreux essais entrepris sur le Gui et plus récemment sur la *Cuscuta* du Trèfle ne m'ont donné jusqu'ici que des résultats partiels, trop peu nombreux pour être publiés.

Dans une autre direction, la biologie d'un champignon parasite, le *Sclerotinia Libertiana*, a été étudiée avec beaucoup de soin par A. de Bary². Parmi les résultats des recherches de ce botaniste éminent, il faut citer ici l'action toxique du contenu des crampons formés par le mycélium au contact des tissus sains des plantes ou des tubercules. On voit, avant la pénétration des filaments au travers des membranes cellulaires, le protoplasme se contracter, les cellules brunir, puis les tissus perdre leur turgescence. Les filaments mycéliens pénètrent alors dans les tissus ainsi désorganisés et s'y ramifient rapidement. Ils provoquent la destruction des lamelles mitoyennes, ce qui amollit les tissus et leur enlève finalement toute consistance.

De Bary s'est assuré que la contraction du protoplasme, le

1. Influence de la nature du sol sur la dispersion du gui (*Viscum album*). *Bull. de la Société royale de botanique de Belgique*, t. XXIX, p. 67, 1891.

2. Ueber einige Sclerotinien und Sclerotienkrankheiten, *Botanische Zeitung*, 1886, nos 22 à 27.

brunissement des cellules, leur désagrégation et le ramollissement des tissus peuvent être obtenus par l'immersion de coupes de tissus vivants dans le suc obtenu en pressant des carottes atteintes par le mycélium de *Sclerotinia*. Ce suc renferme une diastase digestive des lamelles mitoyennes, et de l'acide oxalique, qui peut se trouver à l'état d'oxalate acide de potassium. En milieu neutre, il n'y a aucune attaque de la cellulose.

Ce sont là d'importantes constatations au point de vue du mécanisme de l'action des parasites. Elles ont précédé les premiers travaux sur le rôle des toxines des microbes pathogènes des animaux, et ne semblent pas avoir attiré, comme elles le méritaient, l'attention des expérimentateurs.

Une autre observation fort intéressante fut faite par de Bary sur l'aptitude parasitaire, la virulence, si l'on veut, du *Sclerotinia*. Une spore qui germe dans l'eau pure ne peut attaquer une plante vivante. Lorsque les filaments germinatifs ont vécu pendant un certain temps en saprophytes aux dépens d'une plante morte ou de milieux nutritifs appropriés, ils deviennent capables d'envahir les tissus vivants.

II

PREMIÈRES EXPÉRIENCES

Presque tous les matériaux qui ont servi aux expériences que je vais exposer ont été fournis par un champ d'essais fait en 1897; je me proposais d'y étudier l'influence de l'alimentation minérale sur la descendance de quelques plantes cultivées. J'étais parti de cette idée que des doses extraordinaires d'engrais minéraux, introduites dans le sol, doivent réagir directement sur les appareils végétatifs, puis sur les graines. Les résultats de ces recherches seront publiés dans quelques années.

Le champ d'expériences a été établi dans une bonne terre de jardin, de nature argileuse et contenant :

Matière organique.....	54.40 0/00
Azote total	1.70
Chaux.....	45.60
Potasse.....	0.96
Acide phosphorique.....	3.03

On a tracé quatre parcelles d'égale superficie et de même

fertilité initiale ; on y a répandu les engrais suivants, dont les doses sont calculées pour un hectare :

Parcelle I (P. I) : 1,100 kg. de sulfate d'ammoniaque.

Parcelle II (P. II) : 2,200 kg. de kaïnite à 13 0/0 de potasse anhydre.

Parcelle III (P. III) : 2,200 kg. de superphosphate de chaux à 15 0/0 d'acide phosphorique anhydre.

Parcelle IV (P. IV) : 15,500 kg. de chaux grasse.

Dans chacune des parcelles, on a mis en culture, au commencement d'avril, des pommes de terre, variété Simson, des graines de carottes, variété nantaise, et d'autres espèces. Les tubercules, récoltés en octobre, ont été mis en expérience au mois de février suivant. Sur des pommes de terre coupées en deux et des rondelles de carottes, provenant des quatre parcelles et placées sous cloche humide, on a semé des conidies de *Botrytis cinerea* cultivé sur moût de bière gélatinisé. Cette moisissure ne s'est pas développée sur les tubercules ; mais, sur une rondelle provenant de la P. IV, il se forma une petite colonie bactérienne de consistance glaireuse. C'était un bacille court, introduit sans doute au moment du semis de *Botrytis*. Aussitôt, je renonçai à cette dernière espèce, afin de diriger tous mes efforts sur le bacille ainsi découvert.

Des parcelles de la petite colonie furent inoculées avec un scalpel flambé aux rondelles de P. IV qui avaient résisté premièrement à l'infection, puis à des racines des P. I, II, III ; le tout fut comme précédemment abandonné à la température du laboratoire.

Quatre jours plus tard, toutes les rondelles des P. II et IV étaient infectées par la matière visqueuse des colonies du microbe, mais les rondelles des P. I et III restaient intactes.

A deux reprises, on réinocula ces dernières sans en provoquer l'infection.

L'expérience fut répétée avec des carottes provenant des quatre parcelles, infectées avec le microbe obtenu dans la première série sur les rondelles de P. IV. Les résultats furent les mêmes ; les rondelles de P. II et IV furent rapidement attaquées et ramollies à la température ordinaire ; celles des P. I et III étaient toujours saines.

Une nouvelle série, faite avec des rondelles de racines des

quatre parcelles, mais en prenant la semence sur celle de P. II de la deuxième série, donna un développement général sur les tubercules des P. I, II et IV et à peine quelques colonies sur les rondelles de P. III.

Enfin une quatrième série, dont les rondelles de la P. I de la troisième série ont donné la semence, a donné un développement sur toutes les rondelles des quatre parcelles.

Le microbe était donc devenu parasite pour les carottes des quatre parcelles. Après trois passages sur les tubercules moins résistants, les plus rebelles à l'infection, ceux qui avaient dû absorber plus de phosphates que les premiers, ne pouvaient plus résister à l'invasion microbienne.

Telle la bactériémie charbonneuse qui, dans les expériences de Pasteur, Chamberland et Roux, avait perdu sa virulence en culture artificielle et la recouvrait lorsqu'on la faisait passer successivement sur des animaux d'abord très jeunes, puis de plus en plus âgés et résistants.

Des résultats, absolument comparables, ont été obtenus sur des tubercules de pomme de terre cultivés dans le champ d'expériences, à côté des carottes.

Au début, j'avais essayé d'inoculer les tubercules en y creusant une cavité à l'aide d'un perce-bouchon flambé, puis en y introduisant un peu de matière visqueuse prise sur les rondelles de carottes.

Lorsque le microbe se développait, il envahissait les tissus des tubercules et à la longue les transformait en une pulpe formée des cellules dissociées, mais dans lesquelles persistaient les grains d'amidon. Autour des cellules et finalement dans les cellules, pullulaient des bacilles cylindriques, colorables en jaune par l'iode.

Par la suite, j'ai préféré remplacer ce procédé d'inoculation par un autre beaucoup plus simple. Après lavage, les tubercules sont coupés en deux avec un couteau flambé, et sur les sections on étend la matière visqueuse du microbe au moyen d'un scalpel passé également dans la flamme.

Les tubercules, ainsiensemencés, sont placés sous cloche maintenue humide avec un peu d'eau stérilisée. Le plus souvent, j'employais de grands cristallisoirs à couvercle.

Au mois de mars 1898, des tubercules de pomme de terre

récoltés dans chacune des parcelles ont été inoculés avec le microbe provenant du troisième passage sur les carottes de la P. IV, et ensuite placés à l'étuve à 25°.

Ce sont encore les tubercules de la P. IV qui furent les premiers attaqués : le quatrième jour, ils étaient recouverts superficiellement d'une couche visqueuse épaisse de 4 à 5 millimètres, formée de cellules dissociées et répandant une odeur putride, fécaloïde.

Quant aux tubercules des P. I, II et III, ils ne présentaient aucune altération.

L'expérience a été répétée, d'abord en rafraîchissant les sections des tubercules des P. I, II et III non attaqués dans l'essai précédent, puis sur d'autres tubercules provenant des quatre parcelles. La semence était prise sur les tubercules de la P. IV qui venaient d'être atteints. Les tubercules furent encore placés à 25°. De nouveau, le développement du microbe fut très rapide sur les tubercules de la P. IV ; au bout de 12 heures, il y avait déjà une couche visqueuse bien apparente. Par contre, les tubercules de P. I n'étaient que faiblement attaqués et ceux des P. II et III étaient tout à fait intacts.

Le troisième jour, la couche visqueuse des tubercules de P. IV avait de 3 à 4^{mm} d'épaisseur ; la maladie s'était aussi développée sur les tubercules de P. I, et, sur ceux des P. II et III, il y avait çà et là quelques colonies visqueuses.

Au cinquième jour, les tubercules des P. I, II et III étaient complètement cicatrisés par suite de l'arrêt du développement du microbe, et leur surface était devenue blanche à la suite de la dessiccation des cellules à amidon.

Seuls les tubercules de la P. IV continuaient à pourrir de plus en plus profondément.

Une troisième expérience a été faite à 25° en employant comme semence les zoogléas produites sur les tubercules de la P. IV du 2^e passage.

Après 12 heures, le développement est bien visible sur les tubercules des P. I, III et IV, et est nul sur ceux de la P. II. Il n'y a plus de cicatrisation ultérieure sur les premiers.

Enfin la matière visqueuse du 3^e passage, inoculée sur des tubercules de la P. II, a provoqué l'altération de ces tubercules.

Les tubercules de la P. II, les plus résistants des quatre parcelles, ne pouvaient donc se défendre contre la virulence exaltée par quatre passages successifs sur des tubercules de la P. IV, les plus sensibles à l'infection microbienne.

Le microbe qui a donné lieu à ces expériences a été isolé sur moût de bière et bouillon gélatinisés. Il n'est autre que le *Bacillus fluorescens putidus*, dont les belles colonies et la fluorescence remarquable sont si caractéristiques sur bouillon gélatinisé légèrement alcalin.

Le bacille a été cultivé en solution minérale additionnée de diverses matières organiques.

Voici la composition de cette solution :

Eau	1000 c. c.
Phosphate neutre d'ammoniaque.	2.5 gr.
— neutre de potassium ..	2.5 —
Sulfate de magnésium.....	1.0 —

On y ajoutait 1 0/0 de :

Saccharose,	
Lactose,	
Glycose,	
Mannite,	
Glycérine.	
Peptone,	
Asparagine,	
Succinate de potassium,	
Lactate	—
Citrate	—
Tartrate	—
Bimalate d'ammoniaque.	
Butyrate de sodium.	
Hippurate de	—
Formiate de	—
Acétate de potassium.	

Les trois derniers corps seuls n'ont pas été assimilés par le bacille.

Les cultures faites en solutions de sucres, de glycérine, de peptone et d'asparagine, très vigoureuses, inoculées à la surface des tubercules de la P. IV, ne se sont plus développées.

Le microbe avait perdu sa virulence.

Nous aurons l'occasion de revenir sur ce point.

III.

NOUVEAUX ESSAIS D'INOCULATION

Les derniers résultats que je viens d'exposer datent des premiers jours d'avril de cette année. Je résolus de les compléter par des expériences nouvelles et plus variées.

Les quatre parcelles du champ d'expériences ont reçu, à la fin de mars et au moment du labour, les engrais suivants : les doses sont calculées par hectare :

P. I : 500 kg. de nitrate de soude et 800 kg. de sulfate d'ammoniaque.

P. II : 2,000 kg. de kaïnite dosant 13 % de potasse.

P. III : 2,000 kg. de superphosphate de chaux dosant 15 % d'acide phosphorique.

P. IV : 40,000 kg. de chaux grasse.

Une 5^e parcelle fut établie et reçut une dose de 2,750 kg. de chlorure de sodium par hectare. Elle devait renseigner sur les effets qu'il fallait attribuer à l'action osmotique de sels solubles employés en si grande quantité. Elle permit, par la suite, d'apprécier l'action nuisible du chlorure de sodium sur certains parasites des plantes cultivées.

Au lieu de me borner, comme en 1897, à des essais sur une seule variété de pomme de terre, j'en ai choisi huit; la plupart provenaient de la maison Vilmorin. Les voici : Marjolin, Chave, Early rose, Pousse debout, Chardon, Simson, Blanchard et de Zélande ¹.

Parmi ces variétés, les unes : Marjolin, Early rose, Blanchard sont réputées comme peu résistantes à la maladie ou plus exactement aux divers organismes qui font pourrir les tubercules ². Au contraire, Chave, Simson et surtout Chardon

1. Cette dernière variété a été identifiée par M. H. de Vilmorin, à qui je suis heureux d'exprimer ici mes remerciements.

2. Divers organismes déterminent la pourriture des tubercules de pomme de terre. M. Wehmer (Untersuchungen über Kartoffelkrankheiten, III, *Centralblatt für Bakteriologie*, Zweite Abteilung, t. IV, n° 13 à 21, 1898) a décrit plusieurs Bactéries, parmi lesquelles le *B. Amylobacter*, inoculé autrefois par M. Van Tieghem à des tubercules sains (*Bull. de la Soc. bot. de France*, 1884).

Tout récemment B. Frank (Untersuchungen über die verschiedenen Erreger der Kartoffelfäule, *Ber. der deutsch. bot. Ges.*, 1898, p. 282), attribue la pourriture de la pomme de terre à diverses moisissures, Bactéries, et aussi à des Nématodes, isolés ou associés.

sont peu exposées à la maladie (*Phytophthora*) et à la pourriture.

Dans une sixième parcelle, dont il sera peu question dans ces recherches, les variétés de pomme de terre indiquées étaient cultivées sans engrais spéciaux; nous savons par l'analyse faite en 1897 que la terre est suffisamment fertile. Les tubercules qui y ont été récoltés sont considérés comme normaux, tandis que ceux des autres parcelles avaient dû être influencés par des doses de composés chimiques beaucoup plus fortes que celles qui sont employées d'ordinaire dans les cultures.

Les tubercules de la variété Simson plantés en 1898 avaient été récoltés dans les parcelles correspondantes l'année précédente. A l'influence actuelle des engrais, s'ajoutait donc, pour cette variété, celle qui peut se transmettre par hérédité des caractères acquis. Cette influence est évidente chez les plantes qui se reproduisent par procédé asexuel, particulièrement chez la pomme de terre.

La plantation fut faite avec tous les soins que réclament de tels essais : les conditions de culture étaient bien identiques dans toutes les parcelles, à l'exception, évidemment, des engrais employés.

Cette année on a aussi cultivé dans le même champ d'essais : carotte nantaise, chicorée witloof (à grosse racine), topinambour, et une variété locale de betterave à sucre que je sélectionne depuis quelques années. Ces plantes tuberculeuses ont donné lieu à un petit nombre de recherches, afin de contrôler les résultats nombreux obtenus sur la pomme de terre.

La levée des plantes ne donna lieu à aucune observation spéciale, sauf dans la parcelle V, où le sel a nettement contrarié la germination des graines, mais n'a pas eu d'action bien nuisible sur la pomme de terre. Tous les tubercules employés comme semence ont germé et se sont développés très régulièrement.

Nous savons que le *Bacillus fluorescens putidus*, cultivé dans les milieux liquides, avait perdu toute aptitude à se développer sur les tubercules vivants. Il aurait fallu le conserver actif par des passages successifs sur pomme de terre. Cette précaution fut oubliée, et quand, dans la dernière quinzaine de juin, je voulus reprendre mes essais d'inoculation, j'étais dépourvu de semence virulente pour la pomme de terre.

L'idée me vint de recourir au même procédé qui, au commencement de l'année, m'avait donné accidentellement un bacille parasite de la même espèce. De jeunes tubercules, très aqueux, de la variété Marjolin, furent pris dans chacune des cinq parcelles, coupés en deux, et les surfaces de section exposées pendant un quart d'heure à l'air du laboratoire; les tubercules furent ensuite mis sous cloche humide à l'étuve à 30°.

Seuls, les tubercules de la P. IV se laissèrent entamer par des colonies visqueuses, parmi lesquelles une fut choisie comme souche de mes nouvelles cultures. Elle était formée par un bacille mobile, long de 2 à 5 μ , large de 0,5 à 0,6 μ . La culture sur milieux gélatinisés montra que ce n'était plus le *B. fluorescens putidus*, mais un autre bacille non fluorescent et dont les colonies rappellent étroitement celles du *Bacillus coli communis* : dans la profondeur, ce sont de petits disques jaunâtres, tandis qu'à la surface les colonies d'un blanc nacré sont étalées et ont leur bord circulaire, parfois sinueux.

Les propriétés physiologiques de ce microbe seront exposées plus loin, après la description des résultats qu'ont donnés les inoculations faites sur les diverses variétés de pomme de terre.

La récolte des tubercules des cinq parcelles fut faite le 20 juillet pour les variétés hâtives et le 20 septembre pour les variétés tardives; on classa avec soin le produit de chaque variété dans chacune des parcelles.

Les diverses variétés ont donné des rendements très différents dans les parcelles. Ainsi Marjolin a donné dans la P. I le double de ce qu'a produit chacune des quatre autres parcelles; pour Chave, le maximum de récolte était dans la P. IV; pour Chardon, dans la P. III. Chaque variété semble donc avoir ses exigences propres en ce qui concerne les engrais minéraux. C'est là une influence spéciale que beaucoup d'agronomes sont portés à oublier dans leurs essais sur les plantes cultivées.

Le 31 juillet, je choisis trois tubercules de Marjolin dans la récolte de chacune des cinq parcelles; on les coupe en deux et on les place dans les cristallisoirs à couvercle. Sur chaque moitié, on inocule le bacille cultivé sur tubercules de la même variété récoltés dans la P. IV. Toutes les cultures furent mises à l'étuve à 30°, à 6 heures du soir.

A minuit, une couche gluante, crémeuse, recouvrait tous

les tubercules, mais elle était bien plus épaisse sur ceux de la P. IV. Le lendemain matin, à 8 heures, les différences sont plus nettes : le développement du microbe tend à s'arrêter sur les tubercules des P. I, II et V, et il continue sur les tubercules des P. III et IV. A midi, la surface des premiers est cicatrisée, desséchée, à peine creusée çà et là, à l'endroit des colonies microbiennes. Les sections des tubercules des P. III et IV sont de plus en plus profondément atteintes. Le lendemain, les tubercules de P. III sont cicatrisés, et la maladie continue à pénétrer de plus en plus profondément dans les tissus des tubercules de P. IV. Une coupe perpendiculaire à la section montre une couche glaireuse épaisse de 10 à 12 mm. après le quatrième jour; en dessous, on voit une zone plus claire, mais qui, cependant, est déjà atteinte tout au moins par des produits de sécrétion de la couche infectée.

Cette première expérience montre que, chez la pomme de terre Marjolin, la chaux répandue en abondance sur le sol prédispose à la pourriture bactérienne. C'est la confirmation des résultats obtenus précédemment avec la variété Simson.

Des tubercules d'Early rose provenant des cinq parcelles ont été aussi inoculés avec de la semence prise sur des tubercules de P. IV de l'expérience précédente. Après 6 heures à l'étuve à 30°, toutes les moitiés de tubercules étaient recouvertes d'une couche glaireuse, qui, 24 heures après l'inoculation, avait partout une épaisseur de 4 à 5 mm. sauf sur les tubercules de la P. V. Bien que deux passages consécutifs sur tubercules de Marjolin de la P. IV aient dû développer la virulence, il est évident que la variété Early rose offre peu de résistance à la pourriture bactérienne. C'est un fait qui fut, du reste, vérifié à maintes reprises.

Il convient de remarquer que le chlorure de sodium, répandu sur le sol, avait augmenté un peu la résistance de cette variété.

Dans les essais suivants, plusieurs variétés ont été inoculées en même temps. En voici les résultats généraux :

La variété Blanchard est, comme Early rose, très sensible à la maladie bactérienne : les tubercules des 5 parcelles ont été très fortement atteints.

Pousse debout est très résistante; même les tubercules de P. IV étaient complètement cicatrisés au bout de 40 heures.

Le microbe les avait d'abord entamés, mais ne s'était pas développé ailleurs.

Des tubercules de Chave, ceux de P. I. et IV ont été les plus attaqués, et ceux de P. V les moins atteints.

Quant à Chardon, ses tubercules provenant de la P. IV ont été fortement endommagés; ceux des P. I et II peu, et ceux de la P. III sont restés indemnes. Cette variété n'avait pas été plantée dans la parcelle V, faute de tubercules assez nombreux lors de la plantation.

L'influence de la chaux est encore ici nettement manifeste : les variétés Chave et Chardon ont été nettement atteintes; Pousse debout était moins résistante, au point de permettre la production de zooglées, il est vrai bientôt cicatrisées.

L'acide phosphorique de la P. III a augmenté la résistance de Chardon; la résistance de Chave est diminuée par les engrais azotés; le chlorure de sodium a eu sur les tubercules de cette variété, comme sur ceux d'Early rose, une action favorable. Ce sel ne paraît pas avoir eu d'effet sensible sur la variété Blanchard, celle qui, dans tous ces essais, a été la moins réfractaire à la maladie bactérienne.

Les tubercules des P. I et IV de toutes les variétés ont présenté, à la limite des tissus atteints et des tissus encore sains, une zone noire, visible à la surface autour des zooglées, et en profondeur sur une section perpendiculaire. Cette coloration n'a jamais été remarquée ailleurs, ce qui me fait supposer qu'elle était due à un produit azoté formé par le microbe aux dépens des tissus. La chaux a naturellement activé les phénomènes de nitrification, et provoqué une absorption plus abondante de nitrates par les tubercules.

Les expériences précédentes étaient faites à la température de 30°. Celle qui va suivre a eu lieu à la température du laboratoire, au mois d'août (20-22°). Des tubercules de Chave, Marjolin, Blanchard, Early rose et Chardon, provenant des cinq parcelles, ont été inoculés avec de la semence prise sur un tubercule de Blanchard, complètement pourri.

Les résultats différaient peu de ceux donnés par les mêmes essais à 30°. Tous les tubercules récoltés dans la parcelle IV ont été attaqués avec rapidité.

Les tubercules de Marjolin, Early rose et Blanchard des

5 parcelles ont été rapidement infectés, tellement leur résistance est faible devant l'action du microbe devenu plus virulent par suite du passage sur les tubercules de Blanchard.

Chardon des P. I, II et III a parfaitement résisté. Chave des P. I, II, III et V a d'abord été envahi par le microbe, mais les tubercules étaient cicatrisés à la fin du 3^e jour.

Parmi les variétés de pomme de terre étudiées, il y en a qui sont très exposées à contracter par inoculation la pourriture bactérienne : c'est Marjolin, Early rose et Blanchard ; Chave n'est pas complètement rebelle et Chardon offre, après Pousse-debout, le maximum de résistance.

Comme la récolte de cette dernière variété était peu importante et les tubercules petits, c'est Chardon qui a été adoptée par la suite pour les essais où l'on se proposait de diminuer la résistance. Dans les expériences faites dans la direction opposée, en vue d'accroître la résistance, on se servait surtout de la variété Early rose et parfois de Blanchard.

Lors des recherches faites sur les tubercules de carotte et pomme de terre (Simson) de la récolte de 1897, on avait observé une augmentation progressive de la virulence par des passages successifs sur des produits de la parcelle IV.

Des observations analogues ont été faites avec la variété Chave. Après deux passages sur tubercules des P. IV, le microbe devenait capable d'envahir les tubercules des P. I et II ; après trois passages, ceux des P. III et V étaient aussi atteints.

Une expérience faite le 12 août, à la température ordinaire, comprenait des tubercules coupés en deux des variétés de pomme de terre Simson et Chardon, des rondelles de chicorée à grosse racine et de carotte nantaise. Il y avait des échantillons de chaque variété pris dans les 5 parcelles. La semence provenait d'un 3^e passage sur Early rose, et était donc assez virulente.

La variété Simson s'est montrée beaucoup moins résistante au microbe actuel que lors des inoculations avec le *Bacillus fluorescens putidus* ; aucun tubercule n'a échappé à l'infection, même ceux qui provenaient d'un champ où les conditions de culture étaient normales. Sauf les tubercules de la P. IV, la variété Chardon n'a pas été atteinte, mais sur les surfaces de section s'est développée une moisissure (*Botrytis*?), dont le développement

trop lent n'a pas permis de faire des essais analogues à ceux dont le bacille a été l'objet.

Quant aux rondelles de chicorée et de carotte inoculées avec le microbe virulent pris sur pomme de terre, celles qui provenaient de P. IV ont été complètement atteintes; les carottes de P. I et P. II ont beaucoup souffert. Les carottes de P. V et principalement de P. III, et les chicorées de P. I, de P. V, et surtout de P. III ont le mieux résisté.

L'influence des engrais azotés sur la pourriture bactérienne a été mise de nouveau en évidence par des inoculations faites à des tubercules de Marjolin, provenant d'un champ d'essais sur l'action comparée des engrais chimiques et du fumier de ferme. Ceux-ci avaient été employés à très fortes doses : 800 kg. de sulfate d'ammoniaque, autant de superphosphate, 400 kg. de kaïnite et de sulfate de chaux d'un côté; 80,000 kg. de fumier de l'autre. Tout près, il y avait une parcelle où l'on s'est abstenu d'enfouir un engrais quelconque.

Inoculés avec une race virulente du bacille, les tubercules récoltés dans la parcelle avec engrais chimiques, mis à l'étuve à 35°, ont pourri complètement en l'espace de cinq jours. Tout le parenchyme était devenu pulpeux, et seule l'écorce était restée intacte.

Les tubercules cultivés avec fumier abondant ont pourri, mais moins rapidement que les précédents; au cinquième jour, il y avait encore une couche assez épaisse de parenchyme sain.

Enfin les tubercules, qui n'avaient pas subi l'influence d'un engrais récent, avaient beaucoup mieux résisté à la pourriture que tous les autres.

L'engrais, en permettant une absorption exagérée de combinaisons azotées, avait donc favorisé l'invasion microbienne.

D'une manière générale, la chaux diminue la résistance à la pourriture bactérienne de la pomme de terre, de la carotte et de la chicorée. Les engrais azotés et potassiques ont des effets analogues, mais moins accentués. Au contraire, les phosphates accroissent la résistance chez la pomme de terre, la carotte et la chicorée, et il en est de même, mais à un moindre degré, du chlorure de sodium.

IV

EXPÉRIENCES SUR LES MOYENS DE DÉFENSE DE LA POMME DE TERRE
A L'INVASION MICROBIENNE

Une même variété de pomme de terre oppose aux microbes une résistance qui varie avec la nature de l'engrais employé ; d'autre part, il est des variétés qui sont très sujettes à la pourriture bactérienne, tandis que d'autres sont douées d'une sorte d'immunité plus ou moins complète. Comment convient-il d'interpréter ces propriétés ? Il ne peut être question chez les plantes supérieures de phénomènes comparables à ceux dont les phagocytes des animaux sont les merveilleux instruments. Le protoplasme ne paraît pas avoir été l'objet d'une telle spécialisation chez les plantes vasculaires. Dès lors, il faut s'attendre à l'intervention directe de produits solubles sécrétés par les cellules vivantes ; nous savons, du reste, que beaucoup de plantes supérieures ont recours à des procédés analogues pour se défendre contre les animaux herbivores (production d'alcaloïdes, de substances âcres dans les tissus les plus exposés).

La diminution de résistance occasionnée par la culture de la pomme de terre, de la carotte et de la chicorée, dans les parcelles qui avaient reçu de fortes doses de chaux et de potasse, permettait de croire, *a priori*, qu'il y a intervention de modifications dans l'acidité du suc cellulaire. Cette opinion était d'autant plus légitime que l'addition de phosphate au sol accroît la résistance des mêmes plantes. On sait, en effet, que les phosphates sont l'objet d'une absorption importante, et qu'ils donnent facilement naissance à des sels acides qui se dissolvent dans le suc cellulaire.

Dans une première série d'essais, on a voulu s'assurer si diverses solutions salines avaient une action directe sur la résistance des tubercules aux microbes.

Des tubercules coupés en deux, des variétés Chave et Chardon récoltées dans la P. III, que nous savons très résistants, ont été immergés pendant cinq heures dans des solutions dans l'eau distillée de :

Sulfate de potassium à	2 0/00
— de calcium	1 0/00
— d'ammoniaque	2 0/00
Asparagine.....	2 0/00

On a attribué aux substances amidées, produites en plus grande abondance dans les terrains richement pourvus d'engrais azotés, un rôle dans la propagation de certains champignons parasites des plantes, et particulièrement du *Phytophthora* de la pomme de terre.

En même temps qu'on plongeait des tubercules dans les solutions précitées, on immergeait des tubercules coupés aussi en deux, des variétés Early rose et Marjolin récoltées dans la P. IV, dans les solutions :

Phosphate neutre de sodium à	2 0/00
— neutre de potassium à	2 0/00
— neutre d'ammoniaque à	2 0/00

Tous les tubercules furent inoculés avec le bacille de 4^e passage sur Early rose et mis à l'étuve à 35°.

Les premiers (Chave et Chardon) sont restés intacts; les seconds (Early rose et Marjolin) ont été attaqués.

Les solutions salines n'avaient donc pu, par leur action directe, modifier la résistance naturelle des quatre variétés qui avaient servi à l'expérience.

Des tubercules de Marjolin et Blanchard coupés en deux furent plongés pendant 40 heures dans une solution de phosphate acide de potassium à 1 0/00, puis retirés et inoculés sans rafraîchir les plaies. Après 15 heures de séjour à l'étuve à 30°, ils étaient fortement attaqués.

Dans des tubercules des mêmes variétés, on a creusé avec un emporte-pièce des cavités que l'on a remplies de la solution de phosphate acide de potassium : 40 heures après, on a coupé les tubercules en deux par une section tantôt parallèle tantôt perpendiculaire aux cavités, et on a inoculé les sections. Même au voisinage immédiat des tissus qui avaient été en contact avec la solution saline, le développement du microbe a été très actif.

Le rôle des matières minérales ne peut donc s'expliquer que par l'intervention de phénomènes d'assimilation : il se produit

des substances qui réagissent, soit en modifiant l'acidité du suc cellulaire, soit par un autre mécanisme.

Les expériences qui vont suivre permettent d'attribuer une grande importance aux variations de l'acidité cellulaire.

Des tubercules de Chave et Chardon provenant de la P. III sont immergés pendant 3 heures dans :

Eau de chaux,
Potasse à 1 0/00,
Soude à 1 0/00.

En même temps, on plonge des tubercules coupés en deux d'Early rose et Marjolin récoltés dans la P. I dans des solutions d'acide tartrique, citrique et lactique à 1 0/00.

Les tubercules, retirés des solutions, ont été inoculés avec le bacille du 5^e passage sur Early rose.

Après douze heures de séjour à l'étuve à 35°, tous les tubercules indistinctement étaient atteints.

Les solutions alcalines avaient fait disparaître l'immunité des variétés Chave et Chardon, et les solutions acides, à 1 0/00, n'avaient eu aucune action favorable à la résistance des variétés Early rose et Marjolin.

Les doses d'acides organiques ont été augmentées ; les essais ont alors donné des résultats conformes aux prévisions.

Des tubercules coupés en deux de Marjolin, Early rose, Blanchard, Simson, toutes variétés très peu résistantes, plongés pendant 4 heures dans des solutions :

Acide oxalique à.....	0.5 0/0
— formique à.....	0.5 0/0
— acétique à.....	1 0/0
— tartrique à.....	2 0/0
— lactique à.....	2 0/0
— citrique à.....	5 0/0

puis inoculés et mis à l'étuve sont restés inaltérables. Le microbe ne parvenait plus à pénétrer dans les tissus dont on avait artificiellement accru l'acidité.

La réaction plus ou moins acide du suc cellulaire joue ici un rôle vraiment prépondérant, et se comprendra sans difficultés lorsque nous connaîtrons les procédés employés par le microbe pour s'introduire dans les tissus vivants. Il y a ici intervention d'une diastase qui dissout les lamelles mitoyennes des cellules et

qui, chez la pomme de terre, n'a d'action que dans un milieu à réaction alcaline ou légèrement acide.

L'influence de l'acidité du suc cellulaire a été confirmée par un grand nombre d'essais qu'il est inutile d'exposer en détail. Ainsi, des tubercules de deux variétés éminemment résistantes à la pourriture bactérienne, Préciosa et de Zélande, plongés pendant 2 heures dans une solution de potasse à 1 0/00, perdent leur immunité, même quand on les inocule avec une race de bacille peu virulente. C'est ce qui m'a conduit à découvrir un procédé très simple pour rendre la virulence au bacille lorsque, pour une raison quelconque, il n'est plus capable de se développer sur des tubercules vivants : une heure d'immersion des tubercules dans une solution à 1 0/00, ou même moins, diminuait la résistance et assurait le développement du microbe jusqu'aux tissus les plus profonds.

De prime abord, on pourrait conclure des expériences précédentes que l'immunité de certaines variétés est provoquée par une plus grande acidité du suc cellulaire, tandis que, chez d'autres, la faible résistance résulte d'une acidité moindre. Pour s'en assurer, des tubercules de diverses variétés, cultivées, les unes dans les parcelles du champ d'expériences, les autres ailleurs, ont été soumises à une pression de 300 atmosphères de manière à en exprimer rapidement le jus.

On a ainsi pressé des variétés très résistantes (Préciosa, de Zélande, Chave), d'autres très peu résistantes (Early rose, Marjolin, Blanchard, Simson), ou de résistance moyenne (César, Boule d'Or). Les tubercules de ces deux dernières variétés et ceux de Préciosa provenaient d'un champ différent du champ d'expériences.

L'acidité a été mesurée avec la phénolphthaléine, et l'opération était faite très rapidement pour éviter des modifications provoquées au bout de peu de temps par les phénomènes d'oxydation dus aux oxydases.

Voici les chiffres obtenus pour 100 c. c. de jus ; l'acidité est évaluée en milligrammes d'acide sulfurique :

Préciosa	231.1
De Zélande.....	289.0
Chave de la P. I.....	329.3
— — II.....	242.7

Chave de la P. III.....	329.3
— — IV.....	446.0
— — V.....	300.4
— — VI (sans engrais).....	375.6
Marjolin	271.6
Early rose.....	387.1
Blanchard.....	317.8
Simson de la P. I.....	398.8
— — II.....	248.5
— — III.....	393.0
— — IV.....	340.9
— — V.....	213.8
César.....	300.5
Boule-d'Or.....	364.1

L'examen de ces chiffres montre qu'il n'y a aucune relation entre l'acidité *totale* du jus des tubercules des diverses variétés et leur résistance à l'action des microbes.

Préciosa et de Zélande, tout à fait rebelles, ont une acidité exprimée par 231.1 et 289.0; Blanchard et Early rose, que nous savons fort peu résistantes, ont une acidité représentée par 317.8 et 387.1.

Bien plus, pour Chave, les tubercules provenant de la P. IV ont une acidité égale à 446.0 mg. de SO_4H^2 , et ceux de la P. III n'ont qu'une acidité de 329.3 mg. Or, ceux-ci, à l'état normal, ne sont jamais attaqués, tandis que ceux-là sont un excellent milieu de culture pour le microbe.

Il est donc évident que l'acidité totale ne nous fournit aucune indication sur le mécanisme de l'immunité de certaines variétés de pomme de terre à la pourriture bactérienne.

Mais on a le droit de supposer que la substance active, qui sert à la défense des cellules vivantes, se trouve à l'état soluble dans le suc cellulaire. Dès lors, on peut avoir quelque chance de mettre son action en évidence par des essais analogues à ceux que l'on a faits avec les divers sérums des animaux. Le jus d'une variété très résistante aura-t-il une influence protectrice sur les tubercules d'une autre variété de moindre résistance?

Le plus grand obstacle à des essais de ce genre est la rapidité avec laquelle les jus de pomme de terre s'oxydent et noircissent au contact de l'air; il en résulte des modifications qui, sans doute, ne permettent pas de comparer leurs effets *in vitro* à ceux qu'ils peuvent avoir dans les cellules vivantes.

Quoi qu'il en soit, je signale les résultats suivants.

Des tubercules de *Préciosa* et de la variété de *Zélande* ont été pressés à 300 atmosphères; une partie de chacun des deux jus est chauffée à 100° pendant 5 minutes, tandis qu'une autre portion ne l'est pas.

Pendant 12 heures, on immerge des tubercules coupés en deux des variétés *Blanchard*, *Simson*, *Early rose*, *Préciosa* et de *Zélande* à la fois dans les deux jus cru et cuit; on inocule ensuite avec de la pulpe et on met à l'étuve à 35°.

Après deux jours, les tubercules des variétés *Blanchard* et *Early rose* étaient fortement attaqués.

Simson, variété un peu plus résistante que les deux précédentes, avait été préservée par l'immersion dans le jus cru et cuit de *Préciosa*; l'immersion, dans le jus de la variété de *Zélande*, avait été moins efficace, car les tubercules étaient un peu attaqués.

Quant aux tubercules de *Préciosa*, ils avaient complètement résisté aux microbes; mais ceux de la pomme de terre de *Zélande*, immergés dans le suc de la même variété non chauffé, avaient perdu leur immunité naturelle, tandis qu'ils l'avaient gardée dans le même jus chauffé à 100°, et dans le jus de *Préciosa*, chauffé ou non.

Parmi ces résultats, le plus curieux est certainement l'immunité conférée aux tubercules de *Simson* par l'immersion dans le suc de *Préciosa*. Cette immersion a produit le même effet que l'injection, à un animal, d'un sérum immunisé.

Quant à la diminution de résistance provoquée chez la variété de *Zélande* par son propre jus, on doit probablement l'attribuer aux modifications chimiques provoquées par l'action de l'oxygène.

Il résulte des expériences exposées dans ce paragraphe que la résistance des tubercules de pomme de terre est due à l'existence de substances solubles qui existent dans le suc cellulaire, et dont le rôle peut être annihilé par des solutions alcalines. L'acidité totale des jus des tubercules ne correspond pas à l'action de ces substances protectrices.

V.

DES VARIATIONS DE LA VIRULENCE CHEZ LE BACILLE PARASITE DES
TUBERCULES

Le bacille, qui a été l'objet de ces recherches, est un microbe banal, très répandu dans le sol, l'air et les eaux, mais qui, comme je le montrerai plus loin, est rarement capable de vivre en parasite sur les tubercules de la pomme de terre et d'autres espèces. Il a fallu la rencontre de tubercules privés de résistance, par suite de conditions de cultures exceptionnelles, pour permettre au bacille de se développer sur la pomme de terre et la carotte. Dès lors, sa virulence s'est accrue par des passages successifs sur des tubercules peu résistants, au point que des variétés d'abord rebelles ont fini par se laisser envahir par le parasite. Nous retrouverons ici toutes les gradations entre un organisme saprophyte et le même organisme devenu virulent.

Après cinq ou six passages successifs sur des tubercules d'Early rose, Blanchard ou Marjolin, le bacille m'a paru avoir atteint son maximum de virulence, qui n'a pas été accrue par de nombreux passages consécutifs sur les mêmes variétés. On se rend aisément compte de la virulence par la rapidité du développement sur une variété déterminée cultivée dans la même parcelle.

La virulence disparaît dès que le microbe cesse d'être cultivé sur tubercule vivant. Un passage sur tranche cuite de tubercule suffit à supprimer l'aptitude au parasitisme. Ou bien, si, au lieu de le cultiver sur la pomme de terre, on utilise des bouillons ou des solutions diverses, on enlève la virulence. Et, dorénavant, sans procédé approprié, on ne pourra rendre au bacille son aptitude à vivre en parasite.

Les faits suivants vont le prouver à l'évidence.

Le bacille se laisse cultiver avec la plus grande facilité sur bouillon et moût de bière gélatinisés. Lorsqu'on met des colonies ainsi obtenues à la surface d'un tubercule coupé en deux, ou si, afin d'éviter toute chance de contamination, on enlève avec un emporte-pièce stérilisé un cylindre dans une pomme de terre pour l'introduire dans un tube stérilisé et l'inoculer ensuite, on n'obtient jamais de développement.

Le microbe se laisse facilement cultiver en solution minérale additionnée d'une matière organique assimilable. Le mélange minéral est indiqué à la page 8.

On peut, comme source de carbone, ajouter l'un des corps suivants :

Albumine de l'œuf,	Succinate de potassium,
Peptone,	Citrate —
Asparagine,	Fumarate —
Acide aspartique,	Malonate —
Saccharose,	Lactate —
Raffinose,	Hippurate de sodium,
Amidons cuits,	Butyrate —
Glycogène,	Bimalate d'ammoniaque,
Inuline,	
Gomme arabique,	
Acide pectique,	Phloridzine,
Dextrine,	Leucine,
Mannite,	Tyrosine,
Sorbite,	
Glycose,	Glycocolle,
Galactose,	
Glycérine,	Acétamide.

Je n'ai pas obtenu de développement aux dépens de :

Formiate de sodium,	Valérianate de potassium,
Oxalate d'ammoniaque,	Benzoate de sodium,
Acétate de sodium,	Gallate d'ammoniaque,
Tartrate neutre de potassium,	Phloroglucine,
Tartrate d'ammoniaque,	Acide salicylique,
Paratartrate de sodium	Hydroquinone,
et d'ammoniaque,	Oxamide,
	Urée.

Tous les mélanges organiques que je viens d'énumérer, et dans lesquels le bacille s'est développé, ont été déposés en quantité notable à la surface de tubercules de Marjolin coupés en deux, et légèrement excavés afin d'empêcher le liquide ensemencé de tomber. Pour beaucoup de solutions, les essais ont été répétés plusieurs fois en variant les concentrations. Jamais le bacille ainsi cultivé ne s'est développé sur tubercules vivants qui n'avaient subi aucune préparation spéciale.

Mêmes résultats lorsqu'aux tubercules de Marjolin, on a substitué ceux de variétés Early rose et Blanchard, cependant si peu résistantes.

Tout autres furent les résultats des mêmes ensemencements faits sur des tubercules de Marjolin, d'Early rose et de variétés plus résistantes lorsqu'ils avaient au préalable été plongés pendant une heure ou deux dans une solution de soude ou de potasse à 10/00; sitôt les tubercules retirés de la solution alcaline, on les lavait rapidement avec de l'eau stérilisée, et on y déposait quelques gouttes d'une culture dans les solutions organiques. Après 12 heures de séjour à l'étuve, il se formait à la surface du tubercule une matière beaucoup plus visqueuse que dans les cultures faites sur tubercules normaux.

Un examen microscopique montrait que cette matière visqueuse était formée de cellules peu dissociées, surtout dans la couche superficielle; plus profondément, la viscosité était moindre et la dissociation des cellules plus complète.

Un passage sur tubercule de Marjolin a prouvé que le microbe avait retrouvé sa virulence, et en 24 heures, à 35°, il a occasionné l'attaque des tubercules jusqu'à 10^{mm} de profondeur.

La virulence du bacille disparaît donc dans les cultures en solutions nutritives, et pour la rendre il faut diminuer la résistance des cellules par l'intervention de solutions alcalines. Il semble que, dans les milieux artificiels, le bacille perde la propriété de produire les sécrétions alcalines sans lesquelles la diastase spéciale, qui lui permet de dissocier les cellules par la destruction des lamelles mitoyennes, est sans action sur la pomme de terre.

Et il est alors nécessaire de supprimer toute résistance de la part des cellules vivantes, pour permettre un premier développement du microbe, bientôt suivi de phénomènes de pénétration dans les cellules normales, à l'aide de sécrétions nécessaires.

Ce bacille, je l'ai déjà dit, est des plus répandus dans la nature. Il cause très rarement, dans les champs et les jardins, la pourriture des tubercules de pomme de terre, de navet, de topinambour et d'autres espèces. Wehmer et Frank ¹ ne paraissent pas l'avoir observé dans leurs recherches. Les tissus attaqués se ramollissent par des altérations identiques à celles que l'on peut observer à la suite d'inoculations.

1. *Loc. cit.*

Hormis ces cas, où la virulence doit résulter de conditions spéciales (mauvaise culture, aération imparfaite, excès d'humidité, associations microbiennes favorables, etc.), le bacille étudié n'est pas souvent capable de vivre en parasite sur la pomme de terre. A la surface de tubercules peu résistants coupés en deux, j'ai déposé de la bouse de vache et d'autres excréments animaux, du fumier décomposé, du terreau, des terres de compost, d'étang, de jardin, de bois. Les cas d'altération des tubercules, mis à l'étuve, ont été très rares. Une terre reçue cet été du Haut-Congo avec des plantes a donné un assez grand nombre de colonies parasites de la pomme de terre ; beaucoup ont pu par des cultures appropriées (sur gélatine, sur tranche de pomme de terre, en solutions organiques) être identifiées avec le microbe étudié dans mes recherches actuelles. Il existe aussi dans certaines eaux ; quand on en répand quelques centimètres cubes sur des tranches de tubercules non cuites, on voit parfois des colonies qui appartiennent aussi au *Bacillus coli communis*.

On comprend que, dans les milieux naturels, il soit presque toujours privé de virulence ; il vit en saprophyte, aux dépens des cadavres et débris des plantes, et perd ainsi toute aptitude parasitaire. Nous savons qu'il peut retrouver sa virulence spontanément, puisqu'on le voit parfois provoquer la pourriture de diverses espèces à tubercules.

Dans l'air, les germes du *Bacillus coli communis* possèdent rarement la virulence qui leur permet de vivre en parasites sur la pomme de terre. On l'observe cependant quelquefois sur des tubercules coupés exposés à l'air ; c'est même ainsi que j'ai pu me procurer une race parasite sur les tubercules de Marjolin, cultivés dans la parcelle qui avait été fortement chaulée.

La lumière altère la virulence de ce microbe comme elle diminue celle des bactéries pathogènes des animaux ; des tubercules de Marjolin, ensemencés avec du bacille du 30^e passage et placés sous cloche en plein soleil les 2 et 3 octobre, sont restés intacts, même lorsqu'on a remis les cultures à l'étuve. L'action relativement affaiblie des rayons solaires avait diminué la vitalité des germes et préservé les tubercules.

La chaleur permet également de diminuer et même de supprimer la virulence. De la pulpe prise sur des tubercules Mar-

jolin a été mélangée à un peu d'eau stérilisée, puis chauffée pendant 10 minutes à 45°, 50°, 55° et 60°. Le chauffage à 45° et à 50° ne provoque aucune diminution dans la rapidité du développement lorsqu'on inocule à des tubercules de Marjolin. Il en est autrement du chauffage à 55° et 60°; le microbe n'est pas tué, commence par donner de petites colonies qui s'arrêtent peu de temps après, et il y a cicatrisation du tubercule.

A 40°, la pomme de terre n'est plus attaquée par le bacille, bien que celui-ci puisse continuer à se développer jusqu'à 45°.

Il n'est plus virulent à haute température, de même que la bactériidie charbonneuse. Il y a probablement des modifications dans la nature des sécrétions du microbe.

D'autres changements surviennent dans la virulence lorsqu'on fait des passages entre tubercules d'espèces différentes, comme il s'en présente pour certaines bactéries pathogènes que l'on inocule successivement à diverses espèces animales. Ainsi le *B. coli communis*, cultivé d'abord sur la pomme de terre, puis sur oignon, dégénère bientôt; dès le deuxième passage sur oignon, les cellules de cette espèce ne se laissent plus dissocier. Il en est de même si l'on passe de la pomme de terre sur diverses variétés de radis et de navet. Les tissus de ces deux espèces ainsi infectés ont une réaction nettement acide, et l'acidité de ceux de l'oignon est encore plus forte. J'attribue ces résultats aux substances sucrées que contiennent les bulbes et le navet, et qui, assimilées par le bacille, donnent, comme résidus, des acides organiques en plus grande proportion que chez la pomme de terre.

Après avoir subi l'influence de ces milieux acides, le bacille semble privé de la propriété de sécréter les substances alcalines qui sont nécessaires à la destruction des lamelles mitoyennes.

Chez le topinambour, ce sont les tubercules de la P. I (avec engrais azotés) qui se sont montrés les moins rebelles à l'invasion microbienne.

Les inoculations à des betteraves sucrières et demi-sucrières n'ont guère réussi; seules des racines provenant d'un sol peu fertile ont fourni des cultures assez florissantes.

Le bacille du 20^e passage a été aussi inoculé à des espèces diverses à la température ordinaire :

Racines de radis rose et noir ; tubercules de chou-rave et de

chou-navet, raquettes d'*Opuntia Ficus indica*; tiges de *Bryophyllum calycinum*; tiges de *pourpier* et *tétragone*; pédoncules floraux de *Crinum Mac Oivani*; feuilles charnues de *Sansevieria cylindrica*; feuilles charnues de *Cotyledon fascicularis*; feuilles charnues d'*Aloe arborescens*; fruit de courge.

Partout le microbe s'est développé au voisinage du point d'inoculation et y a formé de petits amas visqueux. Sur l'*Opuntia*, il s'est produit de grandes taches brunes, taches de pourriture, qui ont fini par envahir toute la raquette.

VI

COMMENT LE BACILLE ENVAHIT LES TUBERCULES

Une coupe faite perpendiculairement à la surface d'un tubercule attaqué par le bacille de la pourriture montre qu'en dessous de la pulpe formée par les cellules dissociées et bourrées de bactéries, il y a une zone privée complètement de microbes, et où cependant les cellules commencent à se séparer et présentent leur protoplasme contracté. Il semble que, de la région envahie par les microbes, des produits solubles filtrent au travers des cellules sous-jacentes et réagissent à la fois sur les lamelles mitoyennes et le protoplasme. Afin de les étudier, on a raclé des pommes de terre inoculées et fortement entamées; la pulpe a été mélangée à un peu d'eau, puis on a filtré à la bougie Chamberland. Le liquide filtré, de couleur jaunâtre, avait, comme la pulpe du reste, une réaction nettement alcaline.

Après neutralisation avec l'acide chlorhydrique étendu, le liquide filtré a été partagé en douze portions. Deux servent de témoins; aux autres, on ajoute 1/2 et 1 0/0 de l'un de ces acides : formique, acétique, tartrique, lactique, et les mêmes doses de soude. Dans chaque potion, on a immergé de petits morceaux de tubercule de Marjolin et une goutte d'essence de moutarde pour empêcher le développement de microbes.

Douze heures plus tard, les cellules des deux témoins sont toutes dissociées jusqu'à 2 et 3 millimètres de profondeur, et leur protoplasme est contracté. Il en est de même là où l'on a ajouté 0,5 0/0 d'acide tartrique, 0,5 et 1 0/0 de soude; mais par suite de l'addition de 1 0/0 d'acide tartrique, d'acide lactique à 0,5, d'acide acétique à 0,5 et 1 0/0, la désagrégation est toute super-

ficielle : toutefois, les cellules ont leur protoplasme contracté. En présence d'acide lactique à 0,5 et 1 0/0, d'acide formique à 1 0/0, d'acide citrique à 1 0/0, d'acide oxalique à 0,5 et 1 0/0, il n'y a aucune dissociation des cellules.

Au lieu de morceaux de pomme de terre immergés dans les liquides filtrés obtenus en délayant la pulpe de cette espèce, on peut immerger des morceaux de navet ; la dissociation des cellules est encore plus rapide et plus nette. J'ai vu des tranches de navet épaisses de 5 millimètres complètement amollies, réduites en miettes au bout de 20 heures à la température ordinaire.

La réaction de la pulpe et du liquide qu'elle donne quand on la délaye dans l'eau varie avec la nature des espèces attaquées par le microbe. Avec le navet, la pulpe est légèrement acide ; le liquide, laissé tel quel, attaque les tissus de la pomme de terre et du navet. Additionné de 0,25 0/0 de soude, il attaque encore la pomme de terre, mais plus le navet. Au contraire, si le liquide naturel est additionné de 0,25 0/0 d'acide lactique, il est sans action sur la pomme de terre, mais provoque la dissociation.

Un liquide très actif, à réaction nettement alcaline, et dans lequel les produits devaient être plus concentrés, a été obtenu avec des pommes de terre ; à l'état naturel, il attaquait énergiquement les lamelles mitoyennes de cette espèce, et causait un ramollissement rapide et profond des tissus. Il en était de même lorsqu'on y ajoutait 0,25 et 0,5 0/0 de soude. Dans l'un et l'autre cas, le navet n'était pas attaqué, mais le résultat était tout différent quand on ajoutait au liquide naturel 1 ou 2 0/0 d'acide lactique.

Évidemment ces résultats ne peuvent se comprendre que par des différences de structure ou de composition des lamelles mitoyennes des membranes du navet et de la pomme de terre.

Chez l'oignon cultivé inoculé, la réaction de la pulpe est très fortement acide, et la désagrégation est alors très nette, ainsi que la contraction protoplasmique. Mais, nous le savons déjà, le microbe ainsi cultivé devient incapable de se développer sur pomme de terre, même sur les tubercules des variétés les moins résistantes. Il est dégénéré, ou plus exactement a perdu sa virulence, parce que sans doute il ne peut plus sécréter les substances alcalines qui permettent à la diastase spéciale d'agir sur les membranes de la pomme de terre.

Une dégénérescence semblable a été observée après des inoculations de pomme de terre avec de la pulpe d'un navet dont l'attaque avait été très rapide.

Non seulement le microbe sécrète des substances solubles actives lorsqu'on le cultive comme parasite sur les tubercules, il en produit aussi dans les cultures en solutions organiques, ce qui prouve qu'il n'y a pas, comme on l'a dit, une relation étroite entre les aliments des microbes et leurs sécrétions diastasiques. Des cultures du bacille en solution minérale avec 5 0/0 de saccharose ou de glycérine ont été filtrées; une partie de chaque liquide fut neutralisée avec la soude. Dans les deux portions, on a plongé des tranches minces de pomme de terre et de navet. Cette dernière espèce a été assez fortement attaquée dans la solution acide; la pomme de terre ne l'était guère. Quant à la solution neutralisée, elle est restée sans action sur les tubercules des deux espèces.

Chauffé à 62°, le liquide obtenu par délayage de pulpe de pommes de terre attaquées ne dissout plus les lamelles mitoyennes; les cellules restent adhérentes et les tissus gardent leur consistance. On remarque cependant une altération de la couche superficielle; le protoplasme est contracté et assez souvent désorganisé.

On obtient les mêmes résultats par l'exposition du liquide filtré au soleil pendant huit heures; on les a même constatés à la fin de septembre et au commencement d'octobre, sous l'influence d'une radiation déjà affaiblie.

Ces diverses propriétés des tissus atteints montrent nettement que les liquides mis en expérience contiennent une diastase qui dissout les lamelles mitoyennes, et une autre substance, peut-être plusieurs autres, qui déterminent la contraction du protoplasme, finissent par le tuer, et qui en même temps réagissent sur la digestion de la cellulose.

L'existence de la diastase, une variété de *cytase*, a été établie par la précipitation de l'alcool: plusieurs liquides, filtrés à la bougie Chamberland, traités par cinq volumes d'alcool, ont donné des précipités floconneux blanchâtres. Ceux-ci, dissous dans un peu d'eau distillée et additionnée d'essence de moutarde, causaient le ramollissement et la désagrégation des cellules des morceaux de pomme de terre qui y avaient été immergés pendant 12 heures. Il y avait aussi contraction du protoplasme.

Malgré de nombreuses recherches, je n'ai pu déterminer quelle catégorie de substances interviennent dans la contraction et la mort du protoplasme. Elles varient peut-être selon la nature des espèces tuberculeuses attaquées, puisque les sécrétions du bacille chez la pomme de terre sont alcalines et acides sur le navet. Chez la première espèce, les sécrétions qui coagulent le protoplasme sont un peu plus résistantes à la chaleur que la cytase, mais elles sont détruites à 100°.

Le *Bacillus coli communis* ne sécrète pas d'amylase : aussi les grains d'amidon des cellules dissociées restent entiers ; souvent ils sont gonflés légèrement, et leurs couches concentriques deviennent mieux visibles. Les dessins qu'a faits Wehmer de cellules de pomme de terre attaquées par les bactéries qu'il a étudiées, représentent exactement les effets de l'infection actuelle. On peut même préparer de la fécule relativement pure en broyant la pulpe après dessiccation.

C'est aux substances solubles autres que la cytase qu'il faut attribuer, sans conteste, la diminution de vitalité des cellules qui nous apparaît finalement sous l'état de protoplasme coagulé. Ainsi altérée, la matière vivante est sans défense devant la pénétration microbienne, et celle-ci se trouve encore facilitée par la destruction des lamelles mitoyennes. Il importe, en effet, que celles-ci disparaissent pour permettre aux microbes d'atteindre des couches de tissus de plus en plus profondes, puisque les membranes celluloses sont un obstacle à la diffusion rapide des organismes envahisseurs chez les végétaux supérieurs.

En réalité, les sécrétions du bacille jouent ici un rôle absolument comparable aux toxines animales. Il faut nous attendre à trouver que ces sécrétions vont avoir une action défavorable sur la résistance des variétés les plus rebelles aux microbes. L'expérience a encore confirmé cette prévision.

Plusieurs fois, on a immergé des moitiés de tubercules des variétés Chave, Chardon, Préciosa, de Zélande tout à fait résistants, dans des liquides filtrés de pommes de terre attaquées, liquides non chauffés ou chauffés à 100° pendant 10 minutes. L'immersion des surfaces de section se prolongeait pendant 3 ou 5 heures, puis on les inoculait avec un peu de pulpe de pomme de terre pourrie. Après 15 heures à l'étuve, les tubercules de Chave, Chardon et de Zélande étaient toujours profon-

dément atteints; *Préciosa*, au contraire, était un peu plus résistante.

Dans les essais avec les liquides non chauffés, il y avait action simultanée des diverses sécrétions du microbe, y compris la cytase. Le chauffage à 100° avait détruit non seulement celle-ci, mais aussi la substance qui coagule le protoplasme; néanmoins, le liquide était encore capable de diminuer la résistance des variétés les plus rebelles. Il faut nécessairement admettre qu'après chauffage à 100°, les liquides filtrés renferment encore des substances dont l'action est analogue à celles de toxines.

VII

ÉTUDE COMPARÉE DU BACILLE DES TUBERCULES POURRIS ET DE QUELQUES BACILLES ANALOGUES

Ainsi que je l'ai dit précédemment, le bacille étudié dans mes premières recherches était le *Bacillus fluorescens putidus*; l'autre est, sans aucun doute, une forme du *B. coli communis*. Comme le type si souvent observé par les bactériologistes, il ne liquéfie pas la gélatine, donne des bulles gazeuses lorsqu'on l'inocule en piqure dans le moût de bière gélatinisé; il se développe mieux en présence de l'oxygène que dans le vide, mais peut se développer plus ou moins abondamment en anaérobie. Privé d'air, il réduit les nitrates avec une grande énergie, propriété qui a été signalée pour le *B. coli*, par MM. Huggounenq et Doyon¹, et plus récemment par M. Grimbart².

Désireux de compléter les analogies entre mon bacille et le véritable *B. coli*, j'ai demandé à MM. Calmette (Lille), Malvoz (Liège), et Van Ermengem (Gand), des types authentiques de cette espèce. Ces messieurs m'ont envoyé non seulement le *B. coli*, mais encore quelques formes voisines, entre autres le bacille typhique, avec un empressement auquel j'ai plaisir à rendre ici hommage.

Divers essais de culture ont été faits avec ces microbes en solutions minérales diverses, sur milieux solides variés, sur tubercules normaux et traités par des solutions légèrement alcalines.

1. *Annales de chimie et de physique*, 7^e série, t. XV, p. 145.

2. *Société de biologie*, séance du 10 déc. 1898 et dans ce numéro.

Pendant cet été, j'avais isolé plusieurs races du colibacille de tubercules divers, qui avaient été inoculés, et de divers mélanges nutritifs. Je m'empresse de dire que dans ces conditions les caractères essentiels du microbe ne sont pas modifiés d'une façon quelque peu durable. Dans le bouillon, sur tranches cuites de pomme de terre, sur moût de bière ou bouillon gélatinisés ou gélosés, le microbe a les mêmes aspects de développement.

Ces diverses races du bacille des tubercules ont d'abord été comparées avec les trois *B. coli* reçus de Gand, de Liège et de Lille. On les a cultivées simultanément dans la solution minérale additionnée de :

Saccharose,	Tartrate de K,
Lactose,	— d'AzH ⁴ .
Glycose,	Acétate de K,
Mannite,	Formiate, de Na.
Glycérine,	
Succinate de K,	
Lactate de K,	
Citrate de K,	
Bimalate d'AzH ⁴ ,	
Butyrate de Na,	
Hippurate de Na,	
Asparagine,	
Peptone,	

Tous se sont développés aux dépens des treize corps imprimés à gauche du tableau, en donnant un trouble plus ou moins marqué, et partout un mycoderme ou un anneau mycodermique.

La lactose, le citrate de potassium, l'hippurate de sodium, l'asparagine et surtout la peptone donnent lieu à un développement très actif. Au contraire, les quatre corps imprimés à droite ne sont pas assimilés.

Les microbes comparés ont été inoculés sur des tubercules de même variété, coupés en deux et immergés pendant 3 heures dans une solution de soude de 1 0/00. Tous se sont développés avec une activité égale sur la pomme de terre ainsi préparée, et des passages ultérieurs sur tubercules non préparés ne permettaient pas d'établir de différences entre les diverses formes comparées. Chacune était devenue parasite pour la pomme de terre, le navet et les autres tubercules.

Des essais du même ordre ont été entrepris avec les bacilles suivants :

- Bacilles typhiques de Gand, Liège et Lille ;
- Bacillus enteridis*, de Gaertner ;
- Bacille de la viande de veau de Moorseele, de Van Ermen-
gem ;
- Bacille de Friedländer ;
- Bacille du foie de Lambert, de Van Ermengen.

Tous ces microbes, cultivés sur milieux gélatinisés et sur pomme de terre cuite, présentent avec le *B. coli* des ressemblances qui ont préoccupé à plusieurs reprises les bactériologistes.

Il y avait aussi des essais de culture avec :

- Bacillus fluorescens putidus* ;
- *liquefaciens* :

et un bacille à colonies jaunes isolées de tomates pourries.

Ce dernier microbe ne s'est pas développé dans les diverses solutions minérales et appartient donc à un groupe nettement différent de tous les autres, capables de vivre en solutions organiques.

Aucun bacille typhique ne s'est développé, comme on devait s'y attendre, dans la solution de lactose ; on sait que cette espèce est incapable d'assimiler ce sucre, ce qui permet de la distinguer du *B. coli*.

Les bacilles typhiques ont utilisé la mannite, la glycérine, le succinate, le citrate et le lactate de potassium, mais non les tartrates, le bimalate, le butyrate, l'hippurate, le formiate et l'acétate.

Dans ces essais, le bacille de Friedländer s'est comporté comme le *B. coli*, mais s'est montré plus actif dans les solutions de saccharose, de glycose, de mannite, de glycérine, de succinate d'ammoniaque.

Le *B. fluorescens liquefaciens* s'est développé aux dépens de : saccharose, glycose, mannite, glycérine, succinate d'ammoniaque.

Nous connaissons déjà les exigences du *B. liquefaciens putidus* (page 8) ; elles diffèrent peu de celles du colibacille et du *B. Friedländer*. Il en est de même du *B. de Moorseele*, qui s'est développé abondamment dans la glycérine, le succinate, le lactate,

le citrate, le tartrate, mais qui assimile aussi, mais plus difficilement, la saccharose, la lactose, la glycose, la mannite, le bimalate et le butyrate.

Le *Bacillus enteridis* a des aptitudes peu distinctes : outre les corps utilisés par le bacille de Moorseele, il a assimilé l'hippurate de sodium.

Le bacille du foie de Lambert se rapproche par ses aptitudes du B. de Moorseele, mais a moins bien assimilé le lactate de potassium.

En somme, ces différents types de bacilles, si ressemblants par leur développement morphologique, sont distincts par leurs capacités chimiques, et on ne pourrait actuellement les identifier d'une façon certaine, comme je l'ai fait pour les bacilles des tubercules et le *B. coli communis*.

Ces différences sont-elles le résultat d'adaptations anciennes dont il serait expérimentalement possible de faire disparaître les effets ? C'est là une question à laquelle seules de longues recherches pourront donner une réponse définitive.

Tous les microbes indiqués plus haut, cultivés dans du bouillon peptonisé, ont aussi été inoculés simultanément sur tubercules d'une même variété peu résistante non dénommée¹ ; une partie des tubercules était à l'état normal, et une autre avait été immergée dans la solution de soude à 1 0/00 pendant 3 heures.

Pas un tubercule laissé à l'état normal n'a été attaqué par les diverses formes inoculées ; aucune ne peut donc, après culture dans du bouillon peptonisé, vivre en parasite sur la pomme de terre. Toutes en sont capables lorsqu'on a soin de leur préparer le terrain, de diminuer la résistance des cellules par une solution alcaline. Et non seulement les divers microbes envahissent le tubercule convenablement préparé, mais à partir de ce moment, on peut les faire vivre en vrais parasites sur les tubercules des variétés Marjolin, Early Rose, Simson, Blanchard.

Parmi tous les microbes ainsi devenus parasites des plantes, celui qui m'a le plus étonné est le B. typhique. En 30 heures, à l'étuve à 35°, il avait attaqué les tissus du tubercule jusqu'à 4 et 5 mm. de profondeur ; sa virulence pour la pomme de terre

1. C'est probablement la variété Jaune ronde hâtive.

était supérieure à celle des diverses races de *B. coli communis*, même après de nombreux passages sur cette espèce.

Le deuxième passage du bacille typhique sur la pomme de terre était plus actif encore : la couche pulpeuse avait 10 et 12 mm. d'épaisseur après 24 heures à l'étuve.

Les autres espèces inoculées sur tubercules plongés dans la solution alcaline n'ont pas eu un développement aussi abondant que le bacille typhique. Les colonies étaient moins nombreuses, souvent isolées à la surface de la section, et ce n'est qu'aux passages suivants que l'aptitude parasitaire devenait bien nette.

Remis en culture sur milieux gélatinisés, les bacilles typhiques et les diverses espèces devenues parasites de la pomme de terre avaient les mêmes caractères que dans les cultures originales. Il serait sans doute intéressant de prolonger ces essais et de les multiplier. Peut-être finirait-on par observer des phénomènes de variation définitifs.

VIII

OBSERVATIONS FAITES SUR QUELQUES MALADIES BACTÉRIENNES DES PLANTES

Dans le cours de ces recherches, mon attention a naturellement été attirée par certaines affections microbiennes des plantes cultivées.

L'une des plus curieuses est une altération gommeuse des tubercules de *Cattleya Mossiae* (orchidée) que j'ai eu l'occasion d'étudier en septembre dans les serres de M. D. Massange de Louvrex, à Baillonville (province de Namur). Déjà en 1889, lors de l'Exposition d'horticulture du Trocadéro, j'avais eu l'occasion d'étudier cette maladie au laboratoire de M. Duclaux. Elle consiste dans le ramollissement des tissus des tubercules ; ils deviennent brun foncé, puis noirs.

Si, avec les précautions antiseptiques nécessaires, on prend des tissus atteints pour les mélanger à du moût de bière gélatinisé, on y voit bientôt apparaître de nombreuses colonies formées de courts bacilles. Dès 1889, j'avais été assez disposé à attribuer à ces microbes l'altération des tissus, sous l'influence de conditions peu normales de culture (vraisemblablement d'un excès d'engrais azotés). Les cultivateurs d'orchidées reconnais-

sent du reste que l'emploi du purin comme engrais cause la pourriture gommeuse chez leurs plantes favorites.

Cette année encore j'ai isolé les bactéries contenues dans deux pieds de *Cattleya* appartenant à M. Massange de Louvrex, et j'y ai retrouvé des microbes analogues à ceux que j'avais vus il y a neuf ans. Par des cultures comparatives, je me suis assuré que ce n'est qu'une forme du *B. coli*, capable de se développer aussi vigoureusement sur pomme de terre quand on lui donne pour milieu de culture préparatoire des tubercules traités par la solution de soude 1 0/00.

Les épidémies bactériennes signalées de temps à autre parmi les *Cattleya* cultivés dans les serres d'Europe sont sans nul doute causées par une alimentation anormale, telle que l'emploi d'engrais azotés.

Les faits révélés par les expériences sur la pomme de terre nous permettent de comprendre cette influence indirecte de troubles nutritifs.

Une autre maladie microbienne est la pourriture noire des fruits de tomate.

J'ai isolé aussi le microbe qui existait dans les tomates ainsi attaquées; c'est aussi un bacille, mais bien différent du *B. coli* : il ne croît pas dans les solutions minérales comme cette espèce; sur pomme de terre, il donne des colonies jaunes d'or, et il ne liquéfie pas le bouillon gélatinisé.

Je n'ai jusqu'ici fait aucune observation sur les relations entre le développement de ce bacille et les conditions de culture des tomates.

Une autre maladie de la tomate m'a été signalée cet été à Wavre (Brabant). Dans une serre, tous les pieds de tomate ont été envahis subitement par un bacille qui en a fait pourrir les tiges au bout de quelques jours. Il a fallu arracher tous les plants et renoncer à la culture de la tomate.

La culture du microbe m'a montré que c'était une forme de *Bacillus fluorescens liquefaciens*; d'après les renseignements qui m'ont été fournis par le cultivateur, la maladie n'avait d'autre cause que l'emploi de quantités énormes de fumier et d'engrais liquide¹.

1. ERVIN F. SMITH a décrit sous le nom de *Bacillus solanacearum* une bactérie strictement aérobie qui se développe dans les organes de la pomme de

Il y a peu de temps, je visitais à Louvain des serres dans lesquelles les maraîchers cultivent depuis quelques années la tomate en grand. L'un de ces praticiens me conta un fait qui témoigne d'un réel esprit d'observation et qui s'explique aisément à la lumière des recherches actuelles.

Dans une serre qui avait produit des tomates, une partie du terrain avait été grossièrement labourée et une autre était restée sans soin pendant tout l'hiver. Au printemps, on y avait planté partout de jeunes pieds de tomates, qui se développèrent vigoureusement là où le sol avait été remué, et par conséquent mieux aéré pendant l'hiver. Ailleurs, les tomates n'ont pas poussé et il fallut les jeter. Depuis lors, le maraîcher a toujours soin de bêcher après chaque récolte le sol de ses serres à tomates, qui, bien que cultivées chaque année, avec des engrais abondants, ne présentent plus trace de maladie.

On a le droit de supposer que parmi les microbes qui pullulent dans les terrains richement fumés, il en est diverses espèces capables de devenir parasites sur la tomate, après un premier développement comme saprophytes sur les racines de cette espèce. Si ce mode de vie se prolonge jusqu'au printemps, les microbes seront encore assez actifs, assez virulents au moment de la plantation de jeunes pieds de la même espèce. Et ceux-ci seront exposés à être attaqués. Au contraire, si l'on retourne la terre, la décomposition des racines est plus rapide et les microbes qui la provoquent auront perdu leur virulence lorsque quelques mois plus tard ils se trouveront en contact avec les racines des jeunes plants.

La biologie du *Bacillus coli communis* nous permet de comprendre l'apparition de maladies bactériennes parmi les plantes cultivées, surtout lorsque les conditions de nutrition ne sont plus régulières. C'est souvent le cas dans les jardins maraîchers, dans la culture des primeurs, dans les cultures forcées.

Je viens de citer trois espèces de bactéries banales très répandues dans la terre, et qui peuvent acquérir des aptitudes parasitaires pour les plantes supérieures. Il en est sans doute beaucoup d'autres; plusieurs des bactéries décrites par différents

terre, de la tomate et de l'aubergine, et qui diffère beaucoup de celle que j'ai observée (*Bull. of U. S. Department of Agriculture, Division of Vegetal Physiology and Pathology*, n° 12, 1896).

auteurs comme parasites des végétaux me paraissent appartenir à cette catégorie. Telle l'espèce décrite par MM. Prillieux et Delacroix ¹ sous le nom de *Bacillus caulivorus*, et qui vit dans les tiges de pomme de terre, de *Pelargonium*, les feuilles de *Begonia*, de *Gloxinia*. Elle n'est très probablement qu'une forme du *B. fluorescens liquefaciens*.

Voici encore quelques propriétés du *B. coli communis* parasite des tubercules.

Sur pomme de terre (Marjolin), il ne s'est pas développé à la température de 10-12°, ni au-dessus de 40°.

Il n'attaque pas la cellulose du papier à filtrer, ni celle du coton, de la moelle de sureau, ni des graines de dattier, même si l'on introduit de la glycérine dans la culture pour permettre au microbe de se développer vigoureusement.

Des liquides obtenus en délayant de la pulpe de tubercules attaqués, puis filtrés, très actifs sur les tissus de la pomme de terre, ont été sans action, même après plusieurs jours, sur les variétés de cellulose précitées.

Des cultures dans du bouillon peptonisé, chauffées pendant cinq minutes à 75°, sont stérilisées.

Le bacille n'a pas présenté de spores.

IX

OBSERVATIONS SUR LE PHYTOPHTHORA INFESTANS

Comme pour la maladie bactérienne des tubercules, il existe aussi des relations entre la nutrition minérale des plantes et le développement de leurs champignons parasites.

Les diverses variétés de pomme de terre cultivées dans le champ d'expériences ont donné lieu aux constatations suivantes.

Jusqu'au 6 juillet, il n'y avait aucune trace de *Phytophthora infestans* sur les feuilles. Le lendemain matin, les trois touffes de la variété Early rose de la P. 1 sont fortement attaquées par cette Péronosporacée; les feuilles sont devenues jaunâtres, présentent beaucoup de taches brunes, et, à la face inférieure, il y a de nombreux filaments conidifères.

Sur les touffes de Marjolin de la P. 1, il y a quelques vieilles feuilles malades.

1. *Comptes rendus*, t. CXI, page 208.

Ailleurs, il n'y a aucune trace de parasite, ni sur les autres variétés de la P. I et ni dans les autres parcelles, pas même sur les plants d'Early rose.

Deux poignées de feuilles malades, coupées dans un champ de Marjolin, abondamment pourvues de filaments conidifères, ont été agitées dans de l'eau, que l'on a répandue sur les cinq parcelles au moyen d'un pulvérisateur ; on a fait de même sur la P. VI (sans engrais), qui, trois jours auparavant, avait été traitée à la bouillie bordelaise.

Le 8 juillet, toutes les pommes de terre du champ d'expériences ont été examinées avec le plus grand soin.

La maladie avait, en 24 heures, fait des progrès très rapides et très instructifs.

P. I. Les variétés Early rose, Chardon, Blanchard et Marjolin sont très fortement attaquées.

Chave et de Zélande ordinaire le sont peu, et Pousse debout et Simson sont intactes.

P. II. A peine quelques feuilles malades chez Marjolin et de Zélande. La résistance à la maladie est évidente de même que dans la parcelle suivante.

P. III. Chave et Early rose ont seulement quelques feuilles atteintes.

P. IV. Marjolin assez fortement attaquées, mais moins que dans P. I. Sur Chave et Pousse debout, feuilles malades assez nombreuses.

P. V. Marjolin fort malade, mais moins qu'en P. I ; Chave, Early rose, Pousse debout ont quelques feuilles attaquées.

P. VI. Quelques feuilles malades sur Marjolin et Early rose.

Les progrès de la maladie furent notés : le 16 juillet, par une journée chaude qui suivait plusieurs jours pluvieux et froids ; le 21 juillet, après cinq jours chauds et secs.

Voici le résumé des observations :

Les variétés très sujettes à la maladie, Early rose, Marjolin et Chave ont été les premières atteintes, mais seulement dans la P. I. ; les mêmes variétés ont d'abord résisté dans les autres parcelles à peu près complètement. Huit jours plus tard, ces variétés étaient nettement attaquées, sauf dans les P. V et VI où les progrès de la maladie ont été ralentis par suite de l'influence du

chlorure de sodium et surtout de la bouillie bordelaise.

Des variétés peu exposées à la maladie, Chardon, Simson, Pousse debout, la première, dans la P. I, a été fortement attaquée dès le premier jour de l'apparition de la maladie. Le 16 juillet, les tiges étaient complètement décomposées. Dans les autres parcelles, la même variété a été très peu ou pas malade.

Simson, un peu attaquée dans la P. I, ne l'est pas du tout dans les autres parcelles. .

Des variétés, Blanchard et de Zélande, considérées, en Belgique, comme très exposées au *Phytophthora*, ont été un peu endommagées dans les P. I et IV, mais ont relativement bien résisté ailleurs.

En somme, l'influence des engrais azotés sur la prédisposition de la pomme de terre à être envahie par le *Phytophthora* est incontestable. Les nitrates, les sels ammoniacaux et le fumier, employés en abondance, diminuent la résistance même chez les variétés les plus résistantes (Chardon, Simson, Pousse debout). L'opinion des praticiens est donc très légitime.

La chaux paraît aussi favoriser l'extension de la maladie; ce n'est probablement qu'une influence indirecte en stimulant les phénomènes de nitrification aux dépens des matières organiques azotées:

Lors de l'arrachage des tubercules, on a constaté que beaucoup de tubercules étaient malades dans les P. I et V pour Early rose, et dans la P. V pour Chave. Ceci s'explique par l'influence du chlorure de sodium sur les propriétés physiques du sol : la terre était devenue très compacte et fort humide.

Voici encore un fait qui montre l'action des engrais azotés sur le développement du *Phytophthora infestans*.

Le 12 août, j'ai coupé en deux des tubercules sains de Marjolin, récoltés dans les cinq parcelles; sur chaque moitié, j'ai déposé une foliole de pomme de terre portant des filaments conidifères, et j'avais soin de tourner la face inférieure du côté de la section du tubercule, de manière à y laisser tomber des conidies.

Au bout de sept jours, les tubercules des P. I et IV étaient recouverts d'un mycélium assez abondant, et on y voyait au microscope de vigoureux filaments conidifères du *Phytophthora*.

Il n'y en avait pas sur les tubercules des autres parcelles. Ceux-ci ne se sont pas altérés et les autres n'ont pas tardé à présenter les taches brunes caractéristiques de la maladie.

Le mycélium, ainsi développé, a servi à de nouvelles tentatives d'inoculation, qui ont donné les mêmes résultats.

X

OBSERVATIONS SUR LES SCLEROTINIA

Le *Sclerotinia Fuckeliana*, dont la forme conidienne est le *Botrytis cinerea*, et surtout le *Sclerotinia Libertiana* peuvent être inoculés aux plantes à tubercules et à d'autres espèces. Déjà de Bary avait soumis le *S. Libertiana* à d'intéressantes expériences sur le parasitisme. (Voir page 3.) Je les ai reprises en les dirigeant vers le but que je poursuivais dans mes recherches sur la pomme de terre.

Quelques essais faits avec les conidies de *Botrytis cinerea* n'ont guère réussi. Cette espèce tend à se répandre comme parasite chez plusieurs plantes cultivées (vigne, lis, balsamine, rosier, etc...) Je n'en ai pas observé de cas cette année, et n'ai donc pu faire des cultures en partant d'une forme nettement parasitaire.

Du *Botrytis cinerea*, développé sur des raisins pourrissants, a été cultivé sur moût de bière gélatiné, puis ensemencé sur des tubercules de carotte, de chicorée à grosse racine et de topinambour, récoltés dans les cinq parcelles du champ d'expériences et placés à l'obscurité.

Seules les carottes ont été atteintes, surtout celles de la P. II; celles des P. I et V l'étaient moins, et beaucoup moins encore celles qui provenaient des P. III et IV. Le mycélium du *Botrytis* avait amolli les tissus des racines, et des filaments conidifères sont apparus à la surface.

Les tubercules de topinambour se sont montrés rebelles aux inoculations répétées de conidies du *Botrytis cinerea*. Par contre, ils sont facilement attaqués par le mycélium du *Sclerotinia Libertiana*, qui dans certaines cultures provoque même une affection contagieuse, soit sur les tubercules et la base des tiges des plantes en végétation, soit sur les tubercules conservés en cave. J'en ai rencontré un cas à la fin de septembre, et j'ai obtenu

ainsi une race de *Sclerotinia* dont la virulence était déjà très développée. Elle a été inoculée le 30 octobre sur des tubercules coupés en deux de topinambour, de carotte et de chicorée à grosse racine, de betterave et de pomme de terre conservés en atmosphère humide à l'obscurité et à la température de 20 à 25°.

Le 4 novembre, les tubercules de topinambour des P. I et III sont très nettement envahis et recouverts de mycélium ; les tissus attaqués sont devenus très mous, et, au microscope, on voit le protoplasme contracté à l'intérieur des cellules.

Les tubercules P. II, IV et V ne sont attaqués qu'au voisinage des points d'inoculation du mycélium, ne portent pas de filaments mycéliens ou très peu, et leurs tissus sont restés fermes.

Ce résultat concorde avec deux observations faites, l'une en 1896, l'autre cette année dans un champ de topinambour. On en avait planté sur l'emplacement d'un tas de fumier, dont une quantité assez grande avait été enfouie sur place. Ainsi abondamment pourvus d'engrais azotés, les topinambours végétèrent vigoureusement, mais furent en octobre atteints par le *Sclerotinia Libertiana*.

La partie inférieure des tiges était recouverte d'un mycélium blanc qui a donné plus tard des sclérotés ; beaucoup des tubercules ont pourri par suite de l'invasion des filaments mycéliens.

Une seconde épidémie de *Sclerotinia* a été provoquée cette année à la suite de l'emploi de superphosphate de chaux sur un petit carré tracé au milieu du champ. Les symptômes étaient les mêmes qu'en 1896.

Voilà un résultat tout à fait inattendu : l'acide phosphorique prédispose le Topinambour à la pourriture, tandis qu'il protège la pomme de terre à la fois contre l'invasion bactérienne et celle du *Phytophthora*. Nous en aurons bientôt l'explication.

Parmi les tubercules de carotte et de chicorée, inoculés le 30 octobre, ce sont surtout ceux de la P. II qui sont atteints, recouverts de longs filaments mycéliens, et en grande partie ramollis, sans consistance.

Les racines des deux espèces récoltées dans la P. IV sont moins attaquées que celles de la P. II ; celles de la P. I, moins encore que celles de la P. IV.

De la P. III, les carottes ont bien résisté, tandis que les chicorées sont fortement attaquées et ramollies.

Au contraire, les carottes de la P. V sont assez fortement attaquées, et les chicorées de la même parcelle le sont peu ou point.

Il faut conclure que les engrais potassiques prédisposent la carotte et la chicorée à l'infection par le *Sclerotinia*; les phosphates diminuent cette prédisposition chez la carotte, et le chlorure de sodium a la même action sur les chicorées.

Il y a donc des différences très nettes dans la résistance au champignon entre le topinambour, la carotte et la chicorée cultivés avec des engrais divers.

Chez la betterave à sucre, le maximum de résistance m'a paru se trouver dans la parcelle avec phosphate. Quant à la pomme de terre (Marjolin), je n'ai aperçu aucune différence entre les tubercules des 5 parcelles. Dans mes essais, ces deux dernières espèces se sont montrées fort peu favorables au développement du *Sclerotinia*, qui d'abord avait été cultivé sur le topinambour.

La virulence du *Sclerotinia Libertiana* s'exalte par des passages successifs sur le topinambour, et on ne voit plus bientôt de différence entre la résistance des tubercules qui ont été cultivés dans les diverses parcelles.

Aucune modification dans la virulence de ce champignon ne s'est manifestée à la suite de cultures dans la solution minérale employée précédemment (p. 8) à laquelle on avait ajouté les corps suivants :

Peptone.....	1 0/0
Lactose.....	2.5
Glycérine.....	2.5
Tartrate de potassium.....	2.5

Après seize jours, la solution de tartrate était encore stérile. Dans la solution de peptone, il y avait de petits amas mycéliens distincts, assez étendus, produisant de petits sclérotés noirs à la surface du liquide.

Le mycélium dans la solution de lactose est continu, membraneux, vigoureux, avec de nombreux sclérotés gros et arrondis; ils ont de 3 à 6 millimètres de diamètre.

Enfin, avec la glycérine, il s'est formé des amas mycéliens distincts, partiellement immergés sans sclérotés; ceux-ci ont

commencé à apparaître le vingtième jour, mais étaient peu nombreux au bout d'un mois, tandis que le mycélium restait très filamenteux.

Des petites parcelles des mycéliums de ces trois cultures ont été inoculées à des topinambours ; elles se sont développées avec vigueur ; on n'a relevé d'autre différence qu'une tendance du mycélium, d'abord cultivé dans la glycérine, à produire peu de sclérotés et à former de longs filaments.

Assez souvent, il y a, dans la pourriture mycélienne du topinambour, de la carotte et de la chicorée, symbiose du *Sclerotinia* et du *Bacillus coli communis*. Je m'en suis assuré en plongeant un fil de platine dans des tubercules infectés naturellement ou artificiellement lorsqu'ils sont ramollis ; le fil est ensuite passé à la surface de plaques de moût de bière gélatinisé et stérilisé. Fréquemment, on obtient d'abord des stries de colonies de *Bacillus coli*, puis quelques jours après des mycéliums de *Sclerotinia*.

Il ne faudrait pas en conclure que le champignon soit incapable d'attaquer lorsqu'il est seul les divers tubercules. Quand dans des topinambours, carottes, chicorées, navets, pommes de terre, on prend avec un emporte-pièce stérilisé des cylindres de tissus que l'on introduit aseptiquement dans des tubes stérilisés, on obtient rapidement, après ensemencement de fragments de mycélium bien purs, des végétations vigoureuses avec ramollissement des tissus, dissociation des cellules et contraction du protoplasme.

Ce sont les mêmes altérations que chez la pomme de terre inoculée avec du *Bacillus coli* virulent. Et il y a ici encore intervention d'une diastase (cytase) et d'un autre produit de sécrétion. De Bary¹ l'avait déjà observé, et montré que ce produit sécrété par le *Sclerotinia* est de l'acide oxalique, qui peut se trouver à l'état d'oxalate acide de potassium.

La cytase du *Sclerotinia* a été préparée en pressant des topinambours ramollis dans un linge ; le liquide exprimé est ensuite filtré à la bougie Chamberland. Il a une action très nette sur des morceaux de tubercules de topinambour, de carotte, de chicorée, sur les écailles de l'oignon cultivé, et surtout sur les tissus du navet ; l'action est moindre sur la pomme de terre et nulle

1. *Loc. cit.*, p. 419.

sur la betterave. D'abord, le protoplasme des cellules est contracté; deux heures suffisent à cette réaction. Puis, les lamelles moyennes se dissolvent, les cellules se séparent et les tissus s'amollissent. Tous ces phénomènes avaient bien été observés par de Bary.

Chauffé à 52°, le liquide perd toute action sur les membranes cellulaires, mais continue à provoquer la contraction du protoplasme. Cette modification, qui correspond à la perte de toute résistance à l'infection de la part de la matière vivante et la tue, est causée par l'acide oxalique. On peut l'obtenir avec des fragments de topinambour, de navet, d'oignon immergés dans des solutions d'acide oxalique à 0,5 0/0. ou d'oxalate acide de potassium à 1 0/0. Ces doses ont été calculées d'après l'acidité des sucres filtrés de tubercules de topinambour infectés, acidité qui dans mes essais variait entre 5 gr. 23 et 5 gr. 55 d'acide sulfurique par litre. Ce dernier chiffre m'a paru maximum.

Cette forte acidité est nécessaire pour le travail de la cytase du *Sclerotinia* cultivé sur le topinambour. En effet, les sucres neutralisés par la soude perdent toute action sur les membranes cellulaires, ce que de Bary avait bien constaté; mais ils continuent à provoquer la contraction du protoplasme, tout au moins chez l'oignon, la chicorée et le topinambour. Je n'ai plus observé cette contraction, lorsque les jus étaient alcalinisés légèrement.

Comme chez le *Bacillus coli communis* cultivé sur diverses espèces à tubercules, il y a des variations dans les sécrétions du *Sclerotinia* selon la nature des espèces attaquées. Ainsi, des racines de chicorée inoculées expérimentalement ont donné un suc qui, filtré à la bougie Chamberland, avait une acidité équivalente à 2 gr. 17 par litre. Tel quel, il avait une action énergique sur la pomme de terre, la chicorée et le navet, mais faible sur la carotte, le topinambour et l'oignon; le protoplasme était coagulé et les cellules dissociées.

Ces résultats ne se comprennent que si l'on admet des différences dans la résistance des lamelles moyennes, et aussi dans les substances consommées par le parasite et qui donnent lieu à la production de corps résiduels de nature diverse.

La cytase du *Bacillus coli* cultivé sur pomme de terre est détruite par un chauffage pendant 5 minutes à 62°; pour celle

du *Sclerotinia* qui s'est développé sur le topinambour, il suffit de chauffer à 54° pendant le même temps.

Vraisemblablement, cette différence n'est pas causée par l'acidité du suc de topinambour malade : après neutralisation, le suc ne peut désagréger les tissus de la pomme de terre. Il faut donc supposer que les cytases produites dans les diverses espèces et par les divers parasites constituent des espèces distinctes.

Grâce à sa forte acidité, le suc de topinambour filtré à la bougie de porcelaine est très limpide, se conserve facilement sans altération, et il pourrait aisément servir à des recherches sur la cytase.

Les conditions dans lesquelles les cytases du *Bacillus coli* et du *Sclerotinia Libertiana* dissolvent les lamelles mitoyennes des cellules de la pomme de terre et du topinambour nous expliquent l'action si différente du superphosphate sur la résistance de ces deux espèces à tubercules. La cytase sécrétée dans la pourriture bactérienne expérimentale de la pomme de terre exige, pour son fonctionnement, un milieu alcalin, tout au plus légèrement acide. Celle du *Sclerotinia* ne peut dissocier les cellules du topinambour en milieu neutre, n'agit qu'en milieu acide, et est très active quand l'acidité est très élevée. Dans les cellules végétales, l'acide phosphorique se présente fréquemment à l'état de sels acides, plus solubles. L'absorption des phosphates doit donc augmenter l'acidité des sucs cellulaires.

XI

CONCLUSIONS ET RÉFLEXIONS

A l'état normal, le *Bacillus coli communis* n'est point parasite pour les plantes vivantes : il ne se développe ni sur la pomme de terre, ni sur le navet, ni sur d'autres plantes à tubercules ou non, considérées également dans des conditions normales. Cependant, on peut communiquer à ce microbe l'aptitude parasitaire, lui faire acquérir de la virulence par la culture sur des pommes de terre plongées pendant quelque temps dans des solutions alcalines, qui diminuent la résistance naturelle. Et alors, on voit la virulence s'exalter rapidement par des passages

successifs sur la même espèce de tubercules. Elle peut diminuer et disparaître par suite de la culture sur d'autres espèces, comme le passage de la pomme de terre sur le navet puis sur la pomme de terre ; il en est encore de même quand on cultive le microbe sur des milieux non vivants : tubercules tués, solutions organiques diverses.

Ainsi atténué, le microbe ne recouvre la virulence que sur des tubercules dont la résistance a été diminuée artificiellement, afin de rendre au microbe ses propriétés parasitaires.

Dans les cultures et sans doute aussi dans la nature, la diminution de résistance des végétaux pour leurs ennemis cryptogamiques est fréquente et doit être le point de départ de la transformation des êtres saprophytes en vrais parasites. Tel fut le cas pour les carottes et les pommes de terre cultivées en 1897 et 1898 dans la parcelle où de fortes doses de chaux avaient été répandues. La résistance naturelle des tubercules était affaiblie, au point que des germes du *Bacillus coli communis* et du *B. fluorescens putidus* répandus dans l'air ont pu attaquer les tissus vivants et donner des races nettement parasitaires.

Au contraire, les carottes et les pommes de terre qui avaient subi l'influence de doses élevées de sels de potasse, et surtout de phosphate, ont résisté plus ou moins complètement aux races de bacilles devenues parasites.

Chez le topinambour, les phosphates ont une action toute différente : ils prédisposent les tubercules à la pourriture provoquée par le *Sclerotinia Libertiana*.

Cette diversité d'action d'un même engrais s'explique sans difficulté. En effet, le travail de pénétration des parasites végétaux exige l'intervention de diastases qui dissolvent les lamelles mitoyennes des cellules végétales, diastases qui varient chez la pomme de terre attaquée par le colibacille et chez le topinambour envahi par le *Sclerotinia*. L'une fonctionne le mieux en milieu nettement acide, l'autre en milieu alcalin. Les divers composés chimiques, organiques ou non, qui existent dans les cellules des plantes, donnent sous l'influence des parasites des corps résiduels à réactions variables ; ceux-ci réagissent sur la dissolution des lamelles mitoyennes et par conséquent sur la marche de la maladie.

Dès lors, il est facile de comprendre comment la nature du

sol et la composition des engrais influent nécessairement sur la résistance des plantes à leurs parasites.

Des faits de cet ordre ont été bien démontrés pour la pomme de terre, la carotte, le topinambour et la chicorée, mais encore, chez la première de ces espèces, en ce qui concerne la résistance au *Phytophthora infestans*. Et on peut espérer que des recherches nouvelles montreront qu'il en est ainsi dans toutes les maladies cryptogamiques des végétaux.

La culture, déjà si intensive à l'époque actuelle dans les pays très peuplés, le deviendra plus tard encore davantage. Les substances minérales qui sont nécessaires à la vie des plantes, surtout les phosphates et les sels de potasse, nous semblent ne devoir être épuisées que dans un avenir lointain. L'agriculture n'aura pas sans doute à s'en préoccuper d'ici à plusieurs siècles. Mais elle est menacée d'un danger plus redoutable : l'extension continue des parasites, particulièrement des maladies cryptogamiques, par suite de l'évolution de certains saprophytes.

La variabilité des fonctions chez les organismes inférieurs, leur adaptation graduelle à la vie parasitaire, ne sont aujourd'hui plus contestables. La culture intensive avec ses conséquences fatales, répétition des mêmes plantes sur le même sol, l'emploi d'engrais abondants, qui ne sont pas toujours bien appropriés aux besoins immédiats des plantes, constitue une cause permanente d'infection. Pour préserver les champs cultivés des épidémies meurtrières ainsi occasionnées par des organismes ubiquistes, dont la destruction est impossible, il faudra recourir à des procédés fondés sur l'influence de l'alimentation minérale dans la résistance des plantes à leurs parasites. C'est une voie nouvelle pour la pathologie végétale.

ÉTUDE SUR L'IMMUNITÉ VIS-A-VIS DES COMPOSÉS ARSÉNIQUES

PREMIER MÉMOIRE

DU RÔLE DES LEUCOCYTES DANS L'INTOXICATION PAR UNE COMBINAISON SULFURÉE D'ARSENIC

PAR LE D^r BESREDKA

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Née en zoologie, la phagocytose s'est bientôt transportée sur le terrain de la pathologie, où elle domine en ce moment l'immense question de l'immunité.

Elle semble entrer aujourd'hui dans une nouvelle phase : tout en continuant à relever du domaine de la zoologie et de la médecine, c'est au chimiste maintenant qu'elle nous semble réserver ses révélations.

Par le présent travail, conçu dans le sens bio-chimique, nous n'avons pas d'autre prétention que de prendre, pour ainsi dire, acte de cette nouvelle phase de la phagocytose, en posant quelques jalons sur la voie qui pourra amener un jour à l'étude chimique de l'immunité.

Jusqu'ici, en pathologie, les phénomènes phagocytaires étaient surtout étudiés sur les microbes, et le développement de la théorie, en effet, marchait de pair avec le progrès de la microbiologie.

Quelque évident que parût l'acte phagocytaire, celui-ci souleva cependant au début une tempête d'objections, et cela parce que les deux facteurs en cause, leucocytes et microbes, et surtout le second, étant des êtres vivants, sont sujets à des changements biologiques peu perceptibles au microscope, et en général difficilement accessibles à l'analyse.

Il était de toute évidence qu'en substituant à des microbes

une substance également toxique, mais non vivante, on pouvait simplifier notablement la question.

* * *

La substance choisie comme agent toxique, le sulfure d'arsenic, l'a été pour deux raisons principales : d'abord à cause de son pouvoir toxique élevé, puis à cause de sa couleur, qui permet d'en déceler les moindres traces dans l'organisme ; de plus, grâce à la nature chimique de ce corps, il est possible de suivre son sort dans les organes, même longtemps après qu'il a cessé d'être visible au microscope — avantage dont on est dépourvu quand il s'agit des microbes.

La combinaison sulfurée que nous avons employée est une substance qui, à notre connaissance, n'a pas encore été décrite.

Nous nous réservons d'en faire une étude chimique complète ; pour le moment, bornons-nous à en indiquer le mode de préparation.

On prépare d'abord le trisulfure d'arsenic en faisant passer un courant d'hydrogène sulfuré dans une solution chlorhydrique d'anhydride arsénieux ; ce trisulfure est, comme on le sait, une poudre d'un beau jaune clair, très soluble dans l'ammoniaque.

Si on ajoute à ce trisulfure jaune un peu d'ammoniaque, beaucoup moins qu'il n'en faut pour le dissoudre, et si l'on évapore le mélange à sec au bain-marie, on obtient un corps d'un rouge orangé, difficilement soluble dans l'ammoniaque ; c'est cette substance qui nous a servi au cours de toutes nos expériences.

La quantité de soufre et d'arsenic que contient ce corps correspond à la formule du trisulfure d'arsenic ; mais, ainsi préparé, il contient en plus une toute petite quantité d'azote, provenant probablement d'un peu de sulfhydrate d'ammoniaque, dont il est difficile de l'en débarrasser ; nous désignerons ce nouveau corps, jusqu'à nouvel ordre, sous le nom de *trisulfure rouge d'arsenic*, pour le distinguer du trisulfure jaune bien connu.

Dans le cours de ce travail, nous nous sommes toujours servi de notre trisulfure en suspension aqueuse ; l'animal d'expériences a été le cobaye : le lieu d'injections, la cavité péritonéale.

Etant donnée l'extrême sensibilité du cobaye aux moindres

variations dans la quantité du sulfure injecté, il a fallu établir un dosage des plus précis. Cela ne paraît pas au premier abord être une besogne facile, mais on y arrive à coup sûr quand on est prévenu des écueils à éviter.

Voici comment nous procédons. Le précipité est finement trituré et séché ; nous en prélevons très exactement 5 centigrammes, lesquels, transportés dans un verre à pied stérile, sont additionnés de deux ou trois gouttes d'eau ; on triture de nouveau le mélange de trisulfure et d'eau avec une baguette en verre jusqu'à ce qu'on obtienne une masse homogène (l'eau ne mouille que difficilement le sulfure, et si on ajoute beaucoup d'eau à la fois, il est impossible d'obtenir une répartition égale du précipité) ; c'est alors que l'on ajoute le reste de l'eau (20 c. c. pour 5 centigr.) assez rapidement, tout en agitant le mélange avec la baguette. On obtient ainsi une émulsion parfaitement homogène dont chaque centimètre cube contient une quantité déterminée de sulfure, dans notre cas c'est 0,0025 pour 1 c. c. Aussitôt l'émulsion préparée il faut passer aux inoculations ; celles-ci doivent être faites aussi rapidement que possible ; pendant la durée de l'opération, l'émulsion doit être continuellement agitée pour empêcher les quelques grains de sulfure de tomber au fond du verre.

Avec un peu d'habitude, on parvient de la sorte à doser exactement le trisulfure en suspension, ce qui peut d'ailleurs être facilement vérifié : les animaux de même poids ayant reçu la même dose d'émulsion succombent au bout d'un nombre d'heures presque toujours le même.

Disons ici, d'une façon générale, qu'en faisant l'étude des composés arsénicaux, on ne saurait être trop méticuleux pour ce qui concerne le dosage de la substance injectée.

Qu'il s'agisse de l'intoxication par le sulfure ou un autre sel d'arsenic, il n'y a guère de période d'incubation, comme c'est le cas pour la toxine diphtérique, par exemple ; quelle que soit la dose de cette dernière, on n'arrive pas à tuer un lapin en moins de 24 heures. Il n'en est pas de même avec les sels d'arsenic : si une dose tue l'animal en 48 heures, il suffit de l'augmenter d'une fraction, d'un cinquième, par exemple, pour que la mort d'un animal de même poids survienne déjà au bout de 10 heures ; en doublant la dose on tue en 2-3 heures.

Les animaux de même poids se montrent donc très sensibles vis-à-vis de très petites variations dans la quantité du poison.

Cela revient à dire que les animaux de même espèce, mais de poids différents, réagissent différemment vis-à-vis d'une même dose d'arsenic ; il s'ensuit donc que si on a intérêt à retarder la mort de 24 ou 48 heures, ce n'est pas *une* dose mortelle qu'il faut établir, mais une série de ces doses correspondantes aux différents poids d'animal de même espèce.

C'est là un inconvénient qui ne se présente pas, au même degré, au moins, avec les toxines microbiennes : mais en revanche, la dose mortelle une fois déterminée pour un certain poids d'animal, on peut régler la mort avec une précision presque mathématique, avantage qui nous a été très précieux au cours de cette étude.

Pour bien préciser la dose mortelle d'un composé arsénical, il est de toute nécessité, outre le poids d'animal, de faire entrer en compte le temps dans lequel l'animal meurt. Ainsi, pour donner l'idée de la toxicité de notre sulfure d'arsenic en suspension aqueuse (5 centigr. de sulfure pour 20 c. c. d'eau), nous dirons que 3,5 c. c. de cette émulsion, ou 0,0087 de sulfure tuent un cobaye de 350 grammes en 45 heures.

* * *

Injectons à un cobaye, dans la cavité péritonéale, une dose non mortelle de trisulfure d'arsenic, et faisons de temps à autre des prises d'exsudat péritonéal.

Quelle que soit la dose du poison, alors même que le liquide injecté a la température du corps de l'animal, on constate immédiatement une diminution notable des leucocytes ; ceux-ci, extrêmement nombreux, comme on le sait, à l'état normal, deviennent tout d'un coup rares, et ceci dès les premiers moments qui suivent l'injection.

Cette hypoleucocytose péritonéale n'est point due au choc causé par l'injection (comme cela se produit lors de l'injection des poudres inertes comme du carmin), car elle a une certaine durée, et elle est d'autant plus grande que la dose du sulfure a été plus forte.

Cette hypoleucocytose, caractérisée surtout par la persistance des petits lymphocytes, peut durer jusqu'à 10-12 heures, après

quoi on voit des leucocytes apparaître de nouveau dans le liquide péritonéal; cet afflux se fait d'une façon continue et progressive; l'exsudat, de limpide qu'il était, devient louche, épais; une hyperleucocytose intense se produit; le contenu péritonéal n'est en ce moment qu'une bouillie leucocytaire.

Le stade d'hyperleucocytose a une durée variable suivant les cas. Plus l'animal a été éprouvé, plus l'hyperleucocytose persiste.

Au bout de 2 ou 3 jours en moyenne, tout rentre habituellement dans l'ordre : l'exsudat récupère sa limpidité primitive, le nombre des leucocytes retombe à peu près au taux normal, et l'animal, qui était mal à son aise les premiers temps, retrouve l'appétit et la vivacité de ses meilleurs jours.

Voici pour les leucocytes.

Avant d'examiner la cause qui préside à ces variations, voyons ce que devient pendant ce temps le trisulfure d'arsenic une fois arrivé dans le péritoine.

Déjà un quart d'heure après l'injection, quand on retire une goutte d'exsudat, on peut trouver dans différents champs microscopiques un ou plusieurs leucocytes contenant dans leur intérieur une substance jaune rougeâtre de forme irrégulière, sur la nature de laquelle il est impossible de se méprendre : ce sont bel et bien les grains du trisulfure d'arsenic devenu la proie des phagocytes; à côté d'eux, on voit une quantité considérable d'autres grains, réunis en masses volumineuses, de même couleur, flottant en liberté dans l'exsudat, et frôlant impunément les petits lymphocytes, incapables de faire acte de phagocytose.

Cet état de choses peut durer une heure aussi bien qu'un jour et plus; tout dépend de la dose injectée et de la résistance de l'animal, et à cet égard la règle ne souffre pas d'exception : tant que l'animal est en danger de mort et n'a pas franchi le moment au delà duquel la guérison est certaine, la phagocytose est insignifiante ou presque nulle.

Si l'animal ne peut pas résister au trisulfure, le tableau que nous venons de tracer persiste ou va en s'accroissant à mesure que la mort approche : les leucocytes deviennent très rares dans l'exsudat, et ceux qui contiennent le trisulfure le deviennent encore plus.

Lorsque la mort ne survient pas rapidement et que l'animal

résiste pendant plusieurs jours, on constate à certains moments des poussées aiguës de phagocytose; mais celles-ci alternent avec des phases pendant lesquelles les phagocytes, incapables probablement de fonctionner comme tels, laissent échapper de leur protoplasma des grains déjà englobés, et accélèrent de la sorte le dénouement fatal.

Mais l'aspect de l'exsudat change du tout au tout, si c'est l'animal qui triomphe du sulfure; ce changement, qui se fait progressivement, devient très accusé dès que l'animal entre franchement dans la voie de guérison; c'est alors que l'on assiste à un de ces spectacles dont seule la nature possède le secret: l'exsudat fourmille de leucocytes; à côté des polynucléaires, on voit surtout de beaux macrophages vigoureux, bien mobiles, dont la plupart sont remplis des corpuscules rouges du trisulfure; on aurait beau chercher des corpuscules libres, on n'en trouverait pas un seul; l'acte phagocytaire est à son apogée; il ne peut pas être plus parfait.

En ce moment l'animal est complètement rétabli, et rien dans son extérieur ne trahit les phénomènes importants qui se déroulent dans son péritoine.

Plus l'animal a mis de temps à arriver à cette période, plus est longue la durée de cette crise phagocytaire.

D'ordinaire, déjà le surlendemain on aperçoit une diminution sensible des leucocytes à corpuscules rouges; cette diminution va en progressant jusqu'à la disparition complète du trisulfure de l'exsudat; celui-ci reprend alors sa constitution normale.

Souvent même, le dixième jour après l'injection, on constate encore dans l'exsudat des phagocytes bourrés d'arsenic; mais au delà du douzième jour nous n'en avons jamais trouvé, même si la dose a été très près de la dose mortelle.

*
* *

En présence de ces faits, il est naturel de se poser les questions suivantes: 1° quelle est la signification du processus phagocytaire; 2° quel est le sort du trisulfure dès qu'il cesse d'être vu au microscope, et, 3° quel est en général le mécanisme d'intoxication par cette substance?

Tous ces problèmes, en apparence étrangers l'un à l'autre, se trouvent en réalité intimement liés entre eux, et à tel point

qu'il est impossible d'en aborder un, sans empiéter sur les autres.

Commençons par étudier le mécanisme de l'intoxication. Inexplicable au premier abord, ce mécanisme devient extrêmement simple, dès qu'on réussit à se dégager de la notion courante en chimie, en vertu de laquelle les sulfures d'arsenic sont insolubles dans l'eau.

En réalité, cette notion n'est pas exacte; le fait est que le trisulfure est très difficilement soluble. Insignifiante au point de vue de la grosse chimie, cette nuance acquiert une importance considérable lorsqu'on se place sur le terrain toxicologique : la valeur des phénomènes change dès qu'on opère avec des réactifs aussi sensibles que les cellules, et qu'on tient compte d'un nouveau facteur qui est le temps ou la durée de la réaction.

Il suffit que l'attention soit portée sur ce sujet pour que l'on trouve en abondance des preuves que le trisulfure ne doit sa toxicité qu'à sa propriété de devenir soluble.

En voici une : préparons avec des quantités égales de notre sulfure deux émulsions, une très fine, l'autre contenant de grosses particules ; si la dose de trisulfure est choisie telle qu'en émulsion fine elle tue un cobaye en 35-40 heures, la seconde émulsion, bien que contenant la même dose de sulfure, ne tuera pas un cobaye du même poids.

En d'autres termes, plus on favorise la solubilisation du sulfure dans la cavité péritonéale — par la trituration préalable — plus l'émulsion devient toxique.

Nous possédons un autre moyen, encore plus sûr, qui permet de nous assurer que le trisulfure est susceptible de se dissoudre dans le liquide péritonéal ; c'est le procédé des sacs.

Enfermons dans un sac en moelle de roseau une forte dose de sulfure, une dose pouvant déterminer la mort dans quelques heures; ajoutons-y un peu d'eau et plaçons le tout, après avoir bien fermé le sac, dans la cavité péritonéale d'un cobaye; il va sans dire que toutes les opérations exigent une asepsie rigoureuse. Tout de suite après l'opération, l'animal se met à manger; mais déjà, une demi-heure après, il est manifestement malade : le poil se hérisse, il devient immobile, et il meurt 3 ou 4 heures après l'opération, c'est-à-dire presque aussi rapidement que si la même dose d'arsenic lui avait été injectée directement dans le péritoine.

Introduisons maintenant dans un sac une quantité de sulfure qui, étant injectée directement, ne peut pas déterminer la mort.

Dans ce cas aussi, le cobaye ne tarde pas à mourir, ordinairement au bout de 5 à 7 jours. A l'autopsie on trouve le sac intact, mais contenant beaucoup moins de trisulfure que l'on n'en a mis. Le sang est stérile.

Il est évident que la mort est due au trisulfure passé en solution, et ayant diffusé à travers les parois du sac, la toxicité du trisulfure dissous étant beaucoup supérieure (trois fois environ) à celle du précipité injecté directement dans le péritoine.

Ces expériences avec les sacs sont de nature à répondre à la fois à deux questions que nous nous sommes posées, et qui visent le mécanisme de l'intoxication d'une part, et le rôle du processus phagocytaire, de l'autre.

En effet, les conclusions que comportent ces expériences sont nettes : elles prouvent d'un côté que dans la cavité péritonéale le trisulfure agit et tue en se dissolvant ; d'autre côté, elles nous font saisir l'importance de l'intervention leucocytaire en nous montrant l'effet de la non-intervention.

Sans entrer dans des détails sur ce dernier point, sur lequel nous reviendrons plus tard, continuons l'étude de la solubilité du trisulfure d'arsenic.

Au cours de nos expériences, il nous est arrivé de nous servir d'une même émulsion de sulfure à 24 heures d'intervalle, et nous avons été fort surpris de voir la toxicité de l'émulsion notablement augmentée le lendemain de sa préparation.

Toutes causes d'infection devant être écartées, il a fallu admettre que le trisulfure peut passer à l'état soluble aussi *in vitro*, ce qui a été confirmé par l'analyse chimique.

Une émulsion préparée la veille avait été filtrée; le liquide ainsi obtenu, limpide et incolore, a été divisé en deux portions : une, soumise à l'évaporation lente, a donné un résidu jaunâtre; l'autre portion, mise dans l'appareil de Marsh, a donné un superbe anneau d'arsenic métallique.

Le trisulfure est donc soluble non seulement *in vivo*, mais également *in vitro*.

Voilà pourquoi il est nécessaire, dans l'intérêt de la précision du dosage, de faire usage de l'émulsion aussitôt qu'elle est préparée ; c'est aussi pourquoi, en préparant l'émulsion, il faut tenir

compte non seulement de la quantité d'arsenic employé, mais encore de celle d'eau additionnée.

*
* *

Maintenant, la solubilité du sulfure établie, nous pouvons pousser plus loin l'analyse des phénomènes accompagnant l'inoculation, et mieux nous rendre compte du mécanisme de l'intoxication.

Quelle que soit la dose injectée, avons-nous dit, on observe d'abord une hypoleucocytose qui, tantôt persiste jusqu'à la mort, tantôt cède la place à un stade hyperleucocytaire avec phagocytose intense, si l'issue est favorable.

Ces variations leucocytaires ne sauraient maintenant nous embarrasser : il se passe avec le trisulfure ce qui se passe avec tous les microbes pathogènes ou avec leurs toxines.

En effet, quand on introduit le trisulfure dans la cavité péritonéale, une partie en passe en solution, et ce trisulfure soluble provoque une chimiotaxie négative vis-à-vis des leucocytes présents, d'où hypoleucocytose.

Si la quantité du trisulfure dissous est si considérable que les leucocytes ne peuvent pas s'y habituer, ceux-ci ne reviennent plus ; en vertu de la chimiotaxie négative, ils s'installent définitivement au lieu de leur refuge. Les leucocytes sont bien sauvés, mais l'animal succombe ; et cela parce que, les leucocytes ayant abandonné le champ de bataille qui est la cavité péritonéale, le trisulfure a toute la liberté voulue pour continuer à s'y dissoudre sans aucune entrave.

A l'autopsie on trouve les lésions caractéristiques propres à tous les composés arsénicaux solubles ; on constate, par-ci, par-là, dans la cavité péritonéale, des amas jaune rouge de trisulfure bien visibles à l'œil nu ; ceux-ci sont libres ou bien disposés le long de la grande courbure de l'estomac. La présence de ces amas ne doit pas nous étonner, bien que nous attribuions la mort à la dissolution du trisulfure ; le fait est que pour tuer l'animal, il n'est pas du tout nécessaire que tout le trisulfure injecté passe en solution ; il suffit qu'un tiers ait eu le temps de se dissoudre pour que l'animal puisse en mourir, vu le pouvoir toxique du sulfure soluble.

*
* *

Prenons maintenant le second cas : la dose injectée est inférieure à la dose mortelle.

L'hypoleucocytose, après un certain laps de temps, plus ou moins long suivant la dose, est remplacée par une hyperleucocytose, et celle-ci n'est pas seulement caractérisée par l'afflux considérable des leucocytes, mais en plus, et ce qui explique tout, par une phagocytose aussi parfaite que possible.

Dans ce cas, comme dans le cas précédent, une partie du trisulfure parvient à se solubiliser, ce qui détermine une chimiotaxie négative, mais la quantité du trisulfure soluble n'étant pas aussi considérable que dans le premier cas, les leucocytes finissent par s'y habituer au bout d'un certain temps, ils deviennent positivement chimiotactiques; c'est précisément à ce moment-là que la dissolution ultérieure du trisulfure dans le liquide ambiant vient à être arrêtée; les leucocytes accourus emprisonnent dans leur protoplasma le trisulfure restant : ils l'empêchent ainsi matériellement de sortir de l'enceinte péritonéale pour aller toucher aux éléments sensibles, telles que les cellules nerveuses, par exemple.

Tel est le mécanisme de l'intoxication, examiné de près, microscope en main.

*
* *

Tout en restant sur le terrain solide des faits, nous sommes amenés forcément à établir un lien intime entre l'effet final de l'inoculation et les phénomènes phagocytaires : en cas de phagocytose franche, l'animal est sauvé, tandis qu'une abstention des leucocytes le tue.

On peut maintenant s'expliquer la différence d'effets toxiques suivant que l'on injecte le trisulfure solide ou liquide.

Au premier abord, on aurait pu penser que cette différence tient à la rapidité d'élimination du trisulfure solide; mais les expériences sont là pour prouver le contraire.

Déjà l'examen microscopique suffit pour s'assurer de sa présence dans les leucocytes de l'exsudat péritonéal pendant 10 jours et quelquefois plus; ensuite, si au bout de ce temps on sacrifie l'animal, on voit encore le trisulfure dans les différents feuillets péritonéaux; enfin l'analyse chimique montre que l'élimination

du trisulfure injecté à l'état solide se fait aussi lentement que pour le trisulfure liquide.

L'hypothèse basée sur la rapidité d'élimination est donc à rejeter.

Il ne reste qu'une seule interprétation qui est celle-ci : si le trisulfure solide injecté dans le péritoine ou dans les veines se montre trois fois moins toxique que le trisulfure soluble, cela tient uniquement à ce que dans le premier cas il y a intervention phagocytaire, qui est beaucoup moins prononcée dans le second cas.

En d'autres termes, cette différence de toxicité, présentée par la même substance dans des conditions différentes, permet d'évaluer approximativement le pouvoir antitoxique de l'appareil phagocytaire ; ce pouvoir est tel qu'il préserve l'animal contre une dose environ trois fois mortelle, c'est-à-dire contre une dose qui l'eût tué en quelques heures.

*
* *

Il était intéressant de savoir si les phagocytes avalaient le sulfure comme ils le font de tout corps étranger se trouvant à leur portée, ou bien s'ils étaient capables de sélection.

En injectant à des cobayes, dans la cavité péritonéale, simultanément de la poudre de carmin et du trisulfure, à chaque prise d'exsudat on a pu constater ceci : à côté des rares leucocytes contenant dans leur intérieur de corpuscules jaune rouge de trisulfure, il s'y trouvait des nombreux leucocytes qui étaient bourrés des corpuscules rouges de carmin ; les mêmes phénomènes avaient lieu quand le trisulfure avait été injecté d'abord et le carmin quelque temps après. Il est donc évident que les leucocytes sont capables de faire une sélection.

*
* *

L'ensemble des faits qui viennent d'être relatés serait largement suffisant pour se faire un jugement sur le rôle joué par les leucocytes dans la lutte contre le trisulfure. Mais, vu l'importance du sujet, nous avons cru qu'il ne serait pas superflu d'apporter d'autres faits à l'appui.

Si, comme nous l'affirmons, le système leucocytaire a véritablement pour fonction la défense de l'organisme, il doit exister

entre ces deux éléments, leucocytes et résistance de l'organisme, un rapport tel qu'en faisant varier le nombre des leucocytes, on devrait en apercevoir l'effet sur l'efficacité de la défense.

Le problème qui se posait devant nous consistait donc en ceci : parvenir à diminuer ou à augmenter le nombre naturel des leucocytes, afin d'évaluer ensuite la résistance respective de l'animal dans l'un et l'autre cas.

Nous avons cherché d'abord un procédé pour diminuer les ressources leucocytaires naturelles du péritoine; malheureusement, il n'en existe pas un seul qui soit bon, car toutes les substances qui déterminent une hypoleucocytose plus ou moins durable sont toxiques. Ces procédés sont évidemment contre-indiqués, parce qu'en constatant une moindre résistance de l'animal, on ne saurait à quoi l'attribuer, au fait de l'hypoleucocytose ou bien à la substance surajoutée.

Pour obvier à cette difficulté, nous avons eu recours à un subterfuge que voici : tout en maintenant le nombre normal des leucocytes, nous avons diminué leur pouvoir phagocytaire en injectant préalablement du carmin dans le péritoine.

Cette poudre inoffensive est aussitôt englobée par les leucocytes, qui finissent par s'en charger à tel point que beaucoup d'entre eux ne laissent plus voir la moindre parcelle de protoplasma libre. C'est à ce moment, ou même 24 heures après, l'animal étant en parfaite santé, que nous injectons du trisulfure.

Les leucocytes bourrés de carmin restent en majorité complètement indifférents à cette nouvelle injection; il y en a qui, n'ayant pas englobé le carmin, phagocytent le trisulfure; il y en a enfin qui, n'étant pas bourrés de carmin, gardent encore de la place pour le trisulfure; mais ces deux catégories de leucocytes ne représentent que la minorité.

Le trisulfure injecté se trouve donc, dans notre cas, dans des conditions identiques à celles que l'on aurait si on disposait d'un moyen de déterminer une hypoleucocytose vraie.

Eh bien, l'expérience montre que dans ce cas la résistance de l'animal est notablement amoindrie; si pour tuer un cobaye neuf en 48 heures il faut 4 c. c. de l'émulsion arsénicale, pour déterminer le même effet chez le cobaye ayant reçu du carmin, il suffit d'en injecter 3,5 c. c. ou même 3 c. c., dose qui serait

inoffensive dans les conditions ordinaires. Il en résulte donc que là où l'intervention phagocytaire est paralysée, l'animal meurt de la dose que le témoin du même poids supporte très bien.

*
* *

Il nous reste maintenant à voir si, en augmentant artificiellement le nombre de leucocytes dans la cavité péritonéale, on parvient à renforcer la résistance de l'animal, et à lui faire supporter une dose qui serait mortelle dans des conditions ordinaires.

Cette expérience, très facile à faire quand il s'agit des microbes, des vibrions cholériques, par exemple, ne nous réussissait pas au début quand nous cherchions à l'appliquer au trisulfure.

La raison de notre insuccès est bien simple.

Quand on fait une préparation colorée de l'exsudat péritonéal dans la période phagocytaire, on est tout de suite frappé de l'affinité spécifique qui existe entre le trisulfure et les mononucléaires. Il n'y a que les gros macrophages de la cavité péritonéale qui contiennent des grains rouges, tous les autres — lymphocytes et polynucléaires — n'en contiennent guère ou extrêmement peu. Les seuls arsénicophages véritables (pour le trisulfure) sont donc les gros mononucléaires.

Or, il est évident que comme toutes les substances — eau physiologique, bouillon, aleurone, etc., — qui servent à préparer l'animal, amènent exclusivement une hyperleucocytose polynucléaire, ou, comme nous disons, une polynucléose, cette dernière reste tout à fait inefficace vis-à-vis du trisulfure, et pour en avoir raison il faut amener des mononucléaires. Là précisément est la grosse difficulté ; autant il est facile de provoquer une polynucléose dans la cavité péritonéale, autant il est difficile d'obtenir une mononucléose, c'est-à-dire une hyperleucocytose faite aux dépens des mononucléaires.

On peut cependant y parvenir. Il est vrai que la mononucléose que nous obtenons n'est pas d'une richesse comparable à celle de la polynucléose, mais elle est suffisante pour le but que nous nous proposons.

En effet, nous avons remarqué que la polynucléose que l'on crée artificiellement par différentes substances est suivie d'une

crise mononucléaire, caractérisée par la présence d'un grand nombre de gros macrophages ; ceux-ci, appelés très probablement dans le liquide péritonéal par les polynucléaires, se présentent sous deux aspects : tantôt ils contiennent dans leur intérieur un, deux ou plusieurs leucocytes polynucléaires, tantôt ils y nagent complètement libres.

Pour que l'expérience réussisse, il faut avoir recours à des macrophages libres, dont les ressources phagocytaires n'ont pas été épuisées.

De nombreux essais faits avec différentes substances nous ont montré que les plus favorables à cet égard sont l'hémoglobine et la pilocarpine à très faible dose (1/8 milligr. environ) ; de même nous avons obtenu à plusieurs reprises une mononucléose considérable en faisant simplement une laparotomie, dans des conditions d'asepsie parfaite, cela va sans dire ; dans ce cas, le péritoine, excité par l'opération, fournit un exsudat abondant et riche en macrophages.

Par contre, les exsudats obtenus dans les conditions indiquées par le bouillon et surtout par l'émulsion d'aleurone, si souvent employée, ne se prêtent pas à notre expérience ; les macrophages, bien que présents dans l'exsudat dans ces cas, ne sont pas libres ; occupés à phagocyter les polynucléaires, ils se montrent moins avides du trisulfure.

Il est donc important de bien choisir le moment où les mononucléaires sont à leur maximum, ce qui a généralement lieu 40 à 48 heures après l'injection.

Alors il est facile de s'assurer que l'animal présente une résistance supérieure à celle qu'il a à l'état normal, et ceci malgré la pilocarpine qui est une substance toxique, ou malgré la laparatomie qui devrait plutôt amoindrir sa résistance naturelle. Un cobaye ainsi préparé survit parfaitement à la dose qui tue le témoin du même poids en 48 heures environ ; quand la mort survient plus rapidement sur le témoin, on n'a qu'une survie sur l'autre ; par contre, l'expérience réussit d'autant mieux que la dose injectée tue dans un délai plus long, au bout de trois jours, par exemple.

La différence entre le cobaye neuf et l'animal préparé est bien mise en relief lorsqu'on chauffe préalablement l'émulsion à 38° : tandis que chez le cobaye préparé la phagocytose s'établit

assez rapidement, le cobaye neuf traverse d'abord une période hypoleucocytaire avec les caractères qui ont été décrits plus haut.

*
* *

Jusqu'ici nous nous sommes occupés du mécanisme de l'intoxication et du rôle qui y appartient aux leucocytes. Pour compléter l'histoire toxicologique du trisulfure, il nous faut suivre son sort jusqu'à son élimination complète de l'organisme.

Nous l'avons laissé à l'intérieur des leucocytes; là, avons-nous dit, on l'observe pendant 10-12 jours au plus; que devient-il lorsqu'il cesse d'être visible?

Il est fort probable que pendant son séjour à l'intérieur des phagocytes le trisulfure se transforme en un composé soluble.

En effet, quand on suit de jour en jour l'exsudat d'un cobaye ayant présenté une forte phagocytose, on observe une série de modifications s'accroissant au fur et à mesure qu'on s'éloigne du moment de l'inoculation.

Au début de la période phagocytaire, les masses rouge jaune de trisulfure se trouvant à l'intérieur des phagocytes sont généralement uniques, de dimensions considérables, et occupent le centre des leucocytes; plus tard le tableau change: à côté des rares leucocytes ayant conservé leur caractère primitif, on s'aperçoit que la grande majorité contient dans son intérieur non plus un seul, mais plusieurs corpuscules; ceux-ci sont de petites dimensions, de forme plus régulière et sont situés surtout à la périphérie du leucocyte.

Ces changements font croire à une désagrégation de la masse de trisulfure primitivement englobée, dont les corpuscules désagrégés, réduits en miettes, finissent par se dissoudre dans le protoplasme même du leucocyte.

Quelle est la composition chimique de ce produit soluble? Est-ce simplement le trisulfure qui a passé en solution, comme nous l'avons vu le faire dans le liquide péritonéal, quand il est à l'abri des leucocytes; est-ce un nouveau composé arsénical formé aux dépens du contenu leucocytaire et rendu moins toxique pour l'organisme?

Entre ces deux hypothèses, nous n'hésitons pas à nous ranger à la seconde, et voici pourquoi:

Si le rôle des leucocytes se bornait seulement à retarder la

solubilisation du trisulfure, l'animal succomberait ou au moins tomberait malade une fois la phagocytose terminée. La lenteur de la solubilisation n'empêcherait guère l'animal d'en être fortement incommodé et même d'en mourir, vu le pouvoir toxique du trisulfure soluble.

En réalité c'est précisément le contraire qui arrive. Dès que la phagocytose s'établit franchement, la guérison de l'animal est assurée; l'animal va de mieux en mieux à mesure qu'elle progresse, et quand elle est à sa fin, il ne présente plus la moindre trace de maladie.

Ces faits sont donc en complète contradiction avec la première hypothèse; par contre ils cadrent bien avec la seconde.

L'englobement ne constitue donc pas tout l'acte phagocytaire; celui-ci a, d'après nous, une portée biologique plus profonde.

L'acte essentiel de la phagocytose ne commence que l'englobement terminé, et ce qui nous le fait croire, c'est que *la substance toxique cesse de l'être après le passage à travers le corps des leucocytes*; nous pouvons dire que le poison y a subi une action phtérottoxique ou une sorte de digestion intracellulaire, et en le disant nous n'avons pas d'autre intention que de constater le fait, sans rien préjuger de sa nature intime.

*
* *

Quellesque soient les modifications que subit le trisulfure dans l'intérieur des phagocytes, toujours est-il que l'arsenic reste comme partie intégrante du nouveau composé; grâce aux procédés d'analyse chimique très précis, il est possible de retrouver les traces de son passage à travers les différents organes avant son élimination définitive.

Après avoir injecté à une série de cobayes des doses non mortelles du trisulfure, nous les avons sacrifiés à différents stades d'intoxication; nous avons pu de la sorte nous faire une idée de la répartition de l'arsenic dans les organes et des voies de son élimination.

Les résultats de l'analyse peuvent être ainsi résumés :

1^o L'élimination de l'arsenic est presque nulle les premiers jours qui suivent l'injection;

2^o Elle ne commence à se produire qu'au déclin de la pha-

gocytose, alors que le nombre des leucocytes à trisulfure est sensiblement diminué;

3° L'élimination est lente et se fait par les reins ;

4° A différents moments de l'intoxication on constate la présence de l'arsenic, bien qu'en quantités minimes, dans le foie et la rate ; on n'en trouve pas dans le canal digestif¹.

La recherche de l'arsenic dans les organes demande une série de manipulations préalables, ayant pour but la destruction des matières organiques.

C'est au cours de cette destruction, opération assez délicate, que l'on risque le plus de perdre de l'arsenic, ou de ne pas en trouver du tout, si on a affaire à de très petites quantités.

Après une étude comparative de divers procédés de destruction, nous nous sommes finalement arrêtés à celui proposé par M. Ogier qui, exécuté avec soin, réduit les pertes d'arsenic à des proportions aussi minimes que possible.

■
* *

Avant de passer à la récapitulation des points principaux de ce travail, nous croyons utile de souligner un fait d'ordre général qui se dégage de toute cette étude.

Une des objections les plus importantes contre la doctrine phagocytaire était que les phagocytes peuvent englober seulement les microbes atténués dans leur virulence par l'action préliminaire des humeurs.

Or, pour ce qui concerne le trisulfure d'arsenic, cette hypothèse est naturellement insoutenable ; il ne saurait venir à l'esprit de personne que le trisulfure puisse subir une atténuation quelconque.

Nos expériences avec les sacs en moelle de roseau prouvent d'ailleurs que les humeurs n'exercent aucune influence sur le trisulfure, puisque tous les animaux meurent intoxiqués dans ces conditions.

Or, si le leucocyte est capable d'englober, sans préparation préalable, une substance aussi toxique que le trisulfure, nous ne voyons pas pourquoi il n'agirait pas de même vis-à-vis des

1. Rappelons que les organes avant d'être soumis à l'analyse doivent être soigneusement dépouillés de leur revêtement péritonéal qui est en contact avec le liquide chargé d'arsenic.

microbes ; on est d'autant plus porté à établir une analogie entre ces deux agents que l'on sait que les microbes se défendent en sécrétant autour d'eux des toxines, et que le trisulfure solide se défend en se solubilisant et produisant autour de lui un trisulfure liquide très toxique.

Ainsi, pour nous résumer :

Les leucocytes sont capables d'englober des substances toxiques n'ayant pas subi d'atténuation humorale.

Le trisulfure d'arsenic est actif en tant qu'il est soluble.

La solubilisation commencée *in vitro* se poursuit *in vivo*, dans la cavité péritonéale ; elle y est arrêtée par l'intervention des phagocytes ; d'où immunité relative de l'animal vis-à-vis du trisulfure en suspension aqueuse.

La survie de l'animal se traduit par une chimiotaxie positive et une phagocytose intense ; la mort, surtout lorsqu'elle survient rapidement, par une chimiotaxie négative, prolongée ou définitive, et par une phagocytose insignifiante ou nulle.

La diminution du pouvoir fonctionnel des phagocytes rend l'animal moins résistant ; le renforcement du système phagocytaire accroît sa résistance naturelle.

L'acte phagocytaire ne se borne pas à la chimiotaxie et l'englobement : le trisulfure subit en plus une sorte de digestion intraphagocytaire qui se traduit extérieurement par sa désagrégation et sa transformation en un composé soluble.

Comme tous les composés solubles d'arsenic, le trisulfure, après le passage à travers les leucocytes, s'élimine surtout par le système rénal.

Dans le prochain mémoire, nous étudierons le rôle des leucocytes dans l'intoxication par les composés solubles d'arsenic ; puis nous traiterons de l'immunisation des animaux et des propriétés préventives et antitoxiques du sérum fourni par les animaux immunisés.

La partie chimique de ce travail, ainsi que de ceux qui vont suivre, a été exécutée dans le laboratoire de toxicologie, à la Préfecture de police. Nous sommes très heureux de pouvoir exprimer ici notre vive reconnaissance au savant directeur du laboratoire, M. Ogier, pour son hospitalité et ses nombreux témoignages de sympathie.

ACTION DU B. COLI ET DU B. D'EBERTH SUR LES NITRATES

PAR M. L. GRIMBERT

PREMIER MÉMOIRE

(Travail du laboratoire de chimie biologique de la Sorbonne.)

J'ai déjà montré¹, contrairement à une opinion émise², que le B. Coli et le B. d'Eberth ne dégagent pas d'azote quand on les ensemence dans une solution de peptone à 1 0/0, renfermant 1 0/0 de nitrate de potasse; mais, comme d'autre part, on obtient un dégagement gazeux quand on remplace la solution de peptone par du bouillon de viande peptoné, il m'a paru intéressant de rechercher la cause de cette différence.

Je commencerai par donner quelques détails indispensables sur la technique employée, et sur mes procédés d'analyse.

Afin de recueillir facilement les gaz, j'ai fait usage de matras de 125 c. c., à col étroit, sur lequel est soudé une tubulure latérale deux fois recourbée. Le col du matras peut-être fermé par un bon bouchon de caoutchouc.

Le matras est rempli aux $\frac{3}{4}$ du liquide de culture. Le col est bouché par un tampon de coton, et l'extrémité inférieure du tube recourbé est coiffée par une sorte de dé de caoutchouc. Quant au bouchon, on l'enveloppe de plusieurs doubles de papier à filtre et on l'attache au ballon par une ficelle. Le tout est stérilisé à l'autoclave à 120°, en même temps qu'un ballon renfermant le même liquide de culture, et dont le col est muni également d'un tampon de coton.

Après refroidissement, à l'aide d'une pipette à boule flambée, on achève de remplir le matras tubulé; on remplace le tampon de coton par le bouchon de caoutchouc débarrassé de ses enveloppes. Pour plus de sécurité, on porte le matras ainsi disposé à

1. *Société de biologie*, 2 avril 1898.

2. Cf. HUGOUNENQ et DOYON. *Société de biologie*, 1897, p. 198. *Archives de physiologie*, 1898, p. 390 et 698, et *Annales de Chimie et de Physique*, 1898, p. 151.

l'étuve à 37° pendant 24 heures, après quoi on l'ensemence avec quelques gouttes d'une culture sur bouillon.

Une fois ensemencé, et après avoir ôté le dé de caoutchouc qui ferme la tubulure latérale, on dispose le matras de façon à conduire le gaz sous le mercure. Les gaz recueillis ont été transportés sur la cuve à mercure de Doyère et analysés par les procédés habituels.

Dosage des nitrates. — Les nitrates ont été dosés par la méthode de Schlœsing en opérant comparativement avec une solution de nitrate de potasse pur à 1 0/0. On a eu soin de se débarrasser de l'acide carbonique résultant de l'action de la liqueur acide sur le bicarbonate de potasse qui se forme parfois dans certaines cultures.

Dans le cas le plus fréquent d'un mélange de nitrate et de de nitrite, les deux sels ont été comptés comme nitrate : l'azotite a été ensuite dosé à part.

J'appellerai donc *azotate détruit* la différence entre la quantité d'azotate introduite dans le milieu de culture, et la somme (azotate + azotite) qui reste après l'expérience.

Dosage des nitrites. — Comme j'opérais sur des milieux très chargés de matières organiques et en général colorés, j'ai eu recours à un procédé analogue à celui de Vivier¹, mais que j'ai simplifié sans lui enlever de son exactitude.

Quand on fait agir l'acide nitreux sur l'urée, on obtient toujours, pourvu que celle-ci soit en excès, un volume d'azote double de celui qui correspond à l'acide nitreux.



Vivier opérait à chaud dans un courant continu d'acide carbonique, ce qui nécessitait l'usage d'un réfrigérant ascendant et d'un appareil à lessive de soude de Dupré.

On arrive aux mêmes résultats en opérant à froid de la manière suivante.

Dans une cloche à gaz, à robinet, assez courte pour être maniée facilement sur la cuve à mercure de Doyère, et remplie de mercure, on introduit successivement des volumes égaux des solutions suivantes : 1° milieu renfermant le nitrite à doser; 2° solution d'urée à 10 0/0; 3° acide sulfurique étendu de moitié d'eau.

1. VIVIER. C. R. 1888, t. CVI, p. 138.

La réaction est instantanée. On agite la cloche, et après quelques minutes de repos, on fait passer le gaz dégagé dans une pipette de Salet, garnie de lessive de soude, pour absorber l'acide carbonique.

L'azote restant est transvasé dans une cloche graduée en dixièmes de c. c. que l'on porte dans une éprouvette pleine d'eau. Le volume, réduit à 0° et à 760^{mm}, en tenant compte de la tension de la vapeur d'eau, est transformé en poids par le calcul. La moitié de ce poids appartient à l'azote du nitrite; une simple opération donne ensuite le poids du nitrite correspondant.

Dans trois expériences, dans lesquelles j'ai fait varier la quantité de nitrite en solution, j'ai obtenu, comparativement avec le dosage au permanganate, les chiffres suivants :

	Par le permanganate.	Par le procédé donné.
Première expérience.....	79mg,80	79mg,70
Deuxième expérience....	46mg,32	46mg,20
Troisième expérience....	43mg,60	43mg,65

Le procédé est donc exact; j'ajouterai qu'il n'est influencé ni par la présence des nitrates ni par les matières organiques.

Evaluation de l'azote amidé. — Il était intéressant de se rendre compte de la quantité d'azote existant dans les milieux de culture sous forme de principes amidés divers. Ces corps me paraissant devoir jouer un rôle important dans le procès fermentatif des nitrates sous l'action des bacilles d'Eberth et d'Escherich, j'ai cherché à l'évaluer approximativement en déterminant le volume d'azote que dégage un volume donné de liquide de culture, quand on le traite par l'hypobromite de soude en excès, et cela avant toute intervention microbienne.

Sans doute ce n'est là qu'un procédé très imparfait, car telle substance comme la créatine, par exemple, qui donne tout son azote à froid avec l'hypobromite, n'en dégage que la moitié sous l'action de l'acide nitreux; mais tel qu'il est, il peut donner encore d'utiles renseignements.

Composition des milieux de culture. — Les solutions de peptone à 1 ou à 5 0/0 ont été faites avec la peptone Colas. Le bouillon peptonisé a été préparé par macération à froid, pendant 4 à 5 heures, de viande de bœuf, hachée, dans 2 fois son poids d'eau. Après ébullition pour coaguler l'albumine, on filtre et on ajoute 1 0/0 de peptone Colas; on alcalinise

légèrement avec une solution étendue de soude pure, on porte à l'autoclave pour précipiter les sels terreux et on filtre de nouveau.

Pour les solutions d'extrait de viande, j'ai fait usage du produit commercial vendu sous la marque Armour.

Tous ces milieux ont été additionnés, suivant le besoin, de 1 0/0 de nitrate de potasse pur exactement dosé.

Origine de la semence. — Le coli-bacille provenait des selles normales de l'homme. Il donnait les réactions classiques de l'espèce : indol, fermentation du lactose, etc., etc.

Le B. d'Eberth avait été tiré de la rate d'un typhique ; il ne donnait pas d'indol et ne faisait pas fermenter le lactose ; son identité fut contrôlée par la séro-réaction agglutinante de Widal.

Ces deux microbes avaient été pris chacun parmi les six échantillons qui avaient déjà servi à mes premières recherches.

Remarque. — Tous nos ballons jaugeant exactement 125 c. c., nos résultats se rapportent à 1 gr. 250 de nitrate de potasse.

La durée du séjour à l'étuve a été de 34 jours.

A. — ACTION SUR UNE SOLUTION NITRATÉE DE PEPTONE A 1 0/0.

J'ai déjà montré² que ni le B. Coli ni le B. d'Eberth ne dégagent d'azote quand on les ensemence dans une solution de peptone à 1 0/0 renfermant 1 0/0 de nitrate de potasse. J'ajouterai, aujourd'hui, qu'il se produit seulement une petite quantité de nitrite de potasse qui n'a pas dépassé 50 milligrammes pour le B. Coli, soit 4 0/0, et 48 milligrammes pour le B. d'Eberth, soit 3,8 0/0.

B. — ACTION SUR LE BOUILLON PEPTONISÉ ET NITRATÉ.

Les mêmes bacilles qui sont sans action sur une solution de peptone nitratée donnent, au contraire, un dégagement gazeux quand on les fait vivre dans du bouillon peptonisé nitraté. Un tel changement dans leurs fonctions, résultant de la substitution d'un milieu à un autre, est un fait biologique assez important pour qu'on s'en donne la peine de l'étudier de près.

J'ai donc déterminé : 1^o la nature des gaz recueillis ; 2^o la

1. *Loc. cit.*

proportion d'azotate détruit; 3° le rapport entre cette quantité et le volume d'azote dégagé; 4° la proportion de nitrites restant en solution après l'action des microbes, et 5° le volume d'azote amidé fourni par les 125 c. c. de notre bouillon avant tout ensemencement.

D'autre part, afin de mieux faire voir, au point de vue de leur action sur les nitrates, la différence qui existe entre nos bacilles et les ferments dénitrifiants véritables, je me suis adressé à un agent énergique de dénitrification, au *bacille pyocyanique*, que j'ai ensemencé parallèlement dans une solution de peptone nitratée.

Au bout de 34 jours, *tout dégagement gazeux ayant cessé dans nos trois cultures*, nous trouvons :

	<i>B. Coli.</i>	<i>B. d'Eberth.</i>	<i>B. Pyocyanique.</i>
Réaction.	Neutre.	Neutre.	Très alcaline.
Gaz total.....	39cc,13	36cc,07	100cc,48
Azote.....	28cc,09	25cc,96	100cc,48
CO ²	11cc,04	10cc,10	0cc,00
Azotate détruit....	0gr,112	0gr,118	0gr,910
Soit	8,90 0/0	9,40 0/0	72,80 0/0
Azotite restant....	0gr,289	0gr,261	0gr,136
Soit	23,10 0/0	20,80 0/0	10,88 0/0

Si nous calculons à quel volume d'azote correspond la quantité de nitrate consommé, et si nous comparons ces deux données au volume d'azote amidé capable d'être fourni par les milieux de culture, nous obtenons les chiffres suivants :

	<i>B. Coli.</i>	<i>B. d'Eberth.</i>	<i>B. Pyocyanique.</i>
Azote dégagé.....	28cc,09	25cc,96	100cc,48
Azote du nitrate détruit..	12cc,34	13cc,00	100cc,41
Azote amidé.....	47cc,12	47cc,12	13cc,80

La différence d'action entre ces deux catégories de microbes est frappante.

Le *B. pyocyanique* ne donne que de l'azote sans trace d'acide carbonique. L'acide carbonique, résultant de la combustion du carbone de la matière organique par l'oxygène du nitrate décomposé, se retrouve tout entier à l'état de bicarbonate de potasse, d'où l'alcalinité très prononcée du milieu et l'effervescence qu'il donne par les acides.

Le volume de l'azote dégagé correspond exactement à celui qui résulte de la destruction du nitrate, et il est plus de 7 fois

supérieur à celui que pourraient fournir les principes amidés de la culture.

Avec le *B. coli* et le *B. d'Eberth*, la réaction est neutre; l'azote est mélangé d'acide carbonique.

Le volume de l'azote recueilli est sensiblement *le double* de celui qui correspond au nitrate consommé et la moitié seulement de celui qui serait dégagé par l'hypobromite.

Il est évident que le *B. d'Eberth* et le *coli* n'attaquent pas les nitrates de la même façon que le *B. pyocyanique*. Dans notre expérience, la moitié seulement de l'azote qu'ils dégagent provient des nitrates; l'autre moitié ne peut provenir que des principes amidés du bouillon. Et il n'est pas téméraire de penser que ces substances ont été décomposées par les produits de la réduction du nitrate opérée par les bactéries, au nombre desquels est l'acide nitreux. Je dirai même que le dégagement d'azote n'a lieu que parce qu'il y a des matières amidées dans le milieu de culture. C'est le phénomène secondaire d'une action bien connue, la réduction des nitrates par le *B. d'Eberth* et le *B. coli*.

C. — ACTION SUR LES SOLUTIONS D'EXTRAIT DE VIANDE.

S'il en est ainsi, il est probable qu'en fournissant à la solution de peptone l'azote amidé qui lui manque, on obtiendra un dégagement d'azote.

C'est-ce que l'expérience justifie :

Je me suis adressé dans ce but à l'extrait de viande, comme renfermant les matériaux complexes contenus dans le bouillon. L'extrait de viande, tout le monde le reconnaît, est un assez mauvais milieu de culture par lui-même; on ne pourra donc pas invoquer ses qualités nutritives pour expliquer les différences que l'on va observer dans l'activité plus ou moins grande de la fermentation.

D'ailleurs, nous avons pris soin d'instituer parallèlement une culture dans une solution d'extrait de viande sans peptone, de sorte que nous pourrions comparer la fermentation des nitrates dans les trois milieux suivants : 1^o solution de peptone à 1 0/0; 2^o solution d'extrait de viande à 1 0/0 sans peptone; 3^o solution d'extrait de viande à 1 0/0 additonnée de 1 0/0 de peptone.

Le bacille ensemencé est le *B. Coli*¹.

1. Les mêmes milieux ont été ensemencés également avec le *B. d'Eberth*, mais

Réaction.	PEPTONE	EXTRAIT DE VIANDE	
	à 1 0/0	à 1 0/0	
	Traces d'acidité.	Sans peptone. Traces d'alcalinité.	Avec 1 0/0 de peptone. Neutre.
Gaz total	0	9cc,09	32cc,78
Azote	0	7cc,01	23cc,45
CO ²	0	2cc,08	9cc,33
Azotate détruit....	0	0gr,027	0gr,055
Soit....	0	2,16 0/0	4,40 0/0
Azotite restant....	0gr,050	0gr,408	0gr,220
Soit....	4 0/0	32,64 0/0	17,60 0/0
Azote dégagé.....	0	7cc,01	23cc,45
Azote de l'azotate } détruit	0	2cc,90	6cc,05
Azote amidé.....	13cc,8	19cc,80	36cc,50

Ici encore, le volume de l'azote recueilli est bien supérieur à celui qui correspond à l'azotate détruit.

La peptone, en rendant le milieu plus nutritif, a apporté à la semence la source d'énergie nécessaire à sa fonction, en même temps que l'extrait de viande a fourni au milieu les matériaux azotés indispensables à la réaction secondaire.

Augmentons la proportion d'extrait de viande et nous devons constater du même coup une augmentation dans le volume d'azote dégagé et dans le poids du nitrate détruit. C'est ce que montre l'examen du tableau suivant, relatif à une solution de peptone à 1 0/0 additionnée de 1 0/0 et de 2 0/0 d'extrait de viande.

EXTRAIT DE VIANDE	<i>B. Coli.</i>		<i>B. d'Eberth.</i>	
	1 0/0	2 0/0	1 0/0	2 0/0
Réaction.	Neutre.	Alcaline.	Traces d'acidité.	Faiblement alcaline.
Gaz total.....	32cc,78	44cc,83	16cc,48	31cc,36
Azote	23cc,45	31cc,82	14cc,34	26cc,25
CO ²	9cc,33	13cc,01	2cc,14	4cc,71
Azotate détruit....	0gr,055	0gr,140	0gr,059	0gr,118
Soit....	4,40 0/0	11,20 0/0	4,72 0/0	9,44 0/0
Azotite restant....	0gr,220	0gr,358	0gr,142	0gr,313
Soit....	17,60 0/0	28,64 0/0	11,36 0/0	25,04 0/0
Azote dégagé.....	23cc,45	31cc,82	14cc,34	26cc,25

un accident survenu au moment des dosages ne me permet pas de donner les chiffres se rapportant à la solution d'extrait de viande sans peptone. Dans ce milieu, le *B. d'Eberth* n'avait dégagé que 4 cc, 56 d'azote, tandis qu'il en donnait 14 cc, 34 dans la même solution additionnée de peptone.

Azote de l'azotate)	6cc,05	15cc,44	6cc,45	13cc, »
détruit.....)				
Azote amidé.....	36cc,5	60cc,12	36cc,5	60cc,12

D. — ACTION SUR LA SOLUTION DE PEPTONE A 5 0/0.

Nous avons vu tout à l'heure que 125 c.c. de solution de peptone à 1 0/0 donnaient 13 c.c. 8 de ce que j'ai appelé azote amidé. La peptone contient donc aussi de ces substances capables de réagir sur l'acide nitreux, mais probablement en faible quantité, car, ainsi que je l'ai déjà fait remarquer, la quantité d'azote dégagé par l'hypobromite n'est pas nécessairement égale à celle que donnerait l'acide nitreux.

Si donc on augmente la proportion de peptone, on devra fournir au milieu une quantité suffisante d'azote amidé pour obtenir un dégagement gazeux, et si c'est réellement cet azote amidé qui entre en réaction, nous devons retrouver entre l'azote recueilli et celui du nitrate attaqué la même disproportion que dans les expériences précédentes.

C'est en effet ce que j'ai obtenu dans l'ensemencement d'une solution de peptone à 5 0/0 nitratée.

	<i>B. Coli.</i>	<i>B. d'Esberth.</i>
	Faiblement acide.	Faiblement acide.
Réaction.		
Gaz total	19cc,75	13cc,43
Azote.....	16cc,29	11cc,29
CO ²	3cc,46	2cc,14
Azotate détruit.....	0gr,079	0gr,027
Soit.....	6,32 0/0	2,10 0/0
Azotite restant.....	0gr,050	0gr,024
Soit.....	4 0/0	1,92 0/0
Azote dégagé	16cc,29	11cc,29
Azote de l'azotate détruit..	8cc,70	2cc,90
Azote amidé	71cc	71cc

E. — ACTION SUR LES NITRITES.

Si l'action dénitrifiante des bacilles d'Escherich et d'Eberth est faible, s'ils dégagent peu d'azote, c'est, a-t-on dit, qu'il se forme des nitrites, substances toxiques qui arrêtent le procès fermentatif.

Ce n'est là qu'une hypothèse qu'il est facile de réduire à sa juste valeur par l'expérience suivante :

Une solution d'extrait de viande à 1 0/0, additionnée de 1 0/0 de peptone et de 1 0/0 de *nitrite de potasse*, estensemencée avec du *B. coli* et du *B. d'Eberth*.

Les deux bactéries s'y développent très bien. Un dégagement gazeux s'y manifeste dès le deuxième jour. Au bout de 34 jours, le *B. coli* avait produit 29 c.c. 07 d'azote et le *B. d'Eberth* 22 c.c. 19, c'est-à-dire, un chiffre supérieur à celui qu'ils avaient donné précédemment dans le même milieu renfermant du nitrate.

CONCLUSIONS.

De l'ensemble de ces faits semble résulter cette conclusion que le *B. coli* et le *B. d'Eberth* ne peuvent attaquer les nitrates que si le milieu renferme des principes amidés.

C'est par la réaction secondaire qu'exerce sur ces corps l'acide nitreux qu'il y a dégagement d'azote. Je dis *acide nitreux* et non pas nitrites, ceux-ci ne pouvant agir par eux-mêmes en milieu neutre ou alcalin.

Sans doute le mécanisme intime de cette production d'acide nitreux nous échappe pour le moment. Résulte-t-il de la réduction directe des nitrates par les bactéries ; ou bien est-il mis en liberté par l'action sur les nitrites d'un acide formé aux dépens de certaines substances encore indéterminées du bouillon ?

Les expériences que j'ai entreprises sur cette question ne sont point encore assez avancées pour me permettre d'être affirmatif. Toutefois, on ne saurait invoquer la réaction neutre ou alcaline du milieu pour repousser *a priori* l'hypothèse d'une production d'acide nitreux, celui-ci, au contact des amides, se détruisant au fur et à mesure de sa production.

L'expérience suivante nous donnera d'utiles renseignements à cet égard :

Dans une cloche à robinet remplie de mercure, introduisons successivement une solution de nitrite de potasse à 1 0/0 par exemple, puis une solution d'urée, et enfin un grand excès de lessive de soude pure ; colorons le tout par de la phtaléine et faisons arriver dans le mélange, par très petites portions à la fois, une quantité d'acide sulfurique étendu, insuffisante pour saturer la soude. A chaque addition d'acide, un dégagement d'azote a lieu, et cependant le milieu reste fortement alcalin. En

effet, chaque goutte d'acide, au moment où elle arrive dans la solution alcaline, se trouve, au point où elle tombe, en excès pendant un temps très court, mais suffisant pour agir sur le nitrite. Il en résulte la mise en liberté d'acide nitreux qui réagit à son tour sur l'urée pour donner de l'azote et de l'acide carbonique ; ce dernier est absorbé par la soude et l'azote seul se dégage.

Quelque chose d'analogue ne peut-il se passer dans le bouillon entre les bactéries et les matériaux qui leur sont offerts ?

Ce n'est là qu'une hypothèse, je le sais. Les nouveaux faits que j'espère publier bientôt nous diront jusqu'à quel point elle est fondée. Pour le moment, je me contenterai de résumer ainsi les résultats de ma première série d'expériences :

1° Chaque fois que le *B. coli* ou le *B. d'Eberth* ont donné un dégagement gazeux dans un milieu nitraté, le volume de l'azote recueilli a toujours été supérieur, au moins du double, à celui qui correspond à l'azotate détruit. Par conséquent, *l'azote dégagé ne provient pas exclusivement des nitrates* ;

2° L'action dénitrifiante de ces bacilles est corrélative de la présence de matériaux amidés dans la culture ;

3° Elle semble résulter de l'action secondaire qu'exerce sur ces substances l'acide *nitreux* formé par les bactéries ;

4° La présence de nitrite n'entrave pas les fonctions du *B. coli* ni du *B. d'Eberth*, puisqu'ils se développent très bien dans des milieux renfermant 1 0/0 de ce sel, et y dégagent de l'azote en quantité égale, sinon supérieure, à celle qu'ils produisent dans le même milieu additionné de nitrate.

Le rôle que jouent les matières amidées dans la dénitrification sous l'action du *B. coli*, pourra peut être jeter quelque lumière dans la question encore pendante des pertes d'azote en agriculture. Nous nous proposons de revenir bientôt sur ce sujet.

REVUES ET ANALYSES

MAX SCHOTTELIUS. L'importance des bactéries de l'intestin dans la nutrition. *Archiv. f. Hygiene*, XXXIV, 1899.

Les lecteurs des *Annales* ont été tenus au courant¹ des travaux faits pour étudier l'importance des bactéries de l'intestin dans les phénomènes de nutrition, question que j'avais posée en 1882, dans mes recherches sur la digestion². Nencki avait soutenu depuis, non seulement que la digestion pouvait se faire sans microbes, ce que je n'avais jamais nié, mais encore qu'elle se faisait sans eux, et les expériences de Nuttall et Thierfelder, résumées dans ce recueil, avaient en partie donné raison à Nencki en montrant qu'on pouvait élever et conserver pendant quelques jours de jeunes animaux dans des conditions telles qu'aucun microbe ne pénétrait dans leur canal intestinal, et que, pourtant, ils pouvaient se nourrir et augmenter de poids.

Ceci témoignait que ces microbes du canal intestinal n'étaient pas nécessaires, et à cela il était naturel de s'attendre, étant donnée la variété des diastases digestives qui sont physiologiquement versées dans les intestins. Mais Nuttall et Thierfelder n'avaient ni montré, ni dit que les microbes de l'intestin fussent inutiles, et même on pouvait conclure le contraire de leurs expériences, car les animaux dont on maintenait le canal intestinal stérile poussaient moins bien que les animaux normaux. Au 6^e et au 10^e jour de leur existence, ils n'avaient augmenté que de onze et seize pour cent de leur poids au moment de la naissance, tandis que les chiffres correspondant avaient été de 20 et de 61 pour cent avec les animaux normaux. En présence de ces résultats, M. Max Schottelius, professeur d'hygiène à l'Université de Fribourg, s'est senti encouragé à de nouvelles expériences, qu'il a faites dans des conditions nouvelles et curieuses.

Au lieu d'opérer, comme l'avaient fait MM. Nuttall et Thierfelder, sur de jeunes mammifères extraits de l'utérus au moyen de l'opération césarienne, et nourris de pain ou de lait stérilisés, il en est revenu à la méthode recommandée par Pasteur, de se servir de jeunes poulets éclos, dans une couveuse stérilisée aux dépens d'œufs stériles, et élevés dans des conditions qui assurent la stérilité de leur contenu intestinal.

Ce programme est très simple dans son énoncé; Pasteur ne se

1. Ces *Annales*, t. IX, p. 896, et t. X, p. 411.

2. *Comptes rendus*, t. XCIV, pp. 736, 808, 877, 976.

doutait pas des difficultés qui entourent sa mise en pratique. Gayon avait fait voir, déjà en 1875, que beaucoup d'œufs contiennent, à l'intérieur de la coquille, des germes contre lesquels on ne peut rien. Ceux qui se trouvent à l'extérieur de la coquille peuvent être atteints par des lavages désinfectants : mais un œuf bien lavé et bien propre ne donne pas nécessairement un poussin stérile, et, pour arriver à ce résultat, M. Schottelius a dû prendre des précautions multiples dont il faut lire les détails dans ses mémoires, mais que voici résumées.

Il commence d'abord par les œufs dans une couveuse artificielle. Pendant les 10 premiers jours, on ne prend aucune précaution; on retourne, àère les œufs comme à l'ordinaire. 1 ou 2 jours avant l'éclosion, on les lave avec une solution de sublimé à 5 0/0, chauffée à 40°, puis avec une solution physiologique de sel marin chauffée à la température de l'étuve; on les essuie avec de l'ouate stérile, et on les abandonne pendant 2 heures dans une étuve stérile. On recommence les lavages après cet intervalle, et on enveloppe enfin les œufs dans de la ouate chaude. C'est alors seulement que l'expérience commence.

Celle-ci est faite dans une grande chambre vitrée, d'une contenance de 8 mètres cubes, contenant une table pour les manipulations et une sorte de couveuse-volière, destinée à recevoir les œufs stérilisés et à abriter les jeunes poussins qui doivent en sortir. Cette volière, chauffée de l'extérieur par circulation d'un liquide contenant 5 0/0 de lysol, contient un petit lit d'amiante sur lequel on dépose les œufs, une petite cuvette dans laquelle de l'eau coulant d'un réservoir supérieur est maintenue à un niveau constant, et le reste du sol de la volière est occupé par une couche de 1 centimètre environ de petits cailloux du Rhin, lavés, stérilisés, et mélangés avec des débris de coquille. Le contenu de la volière est stérilisé dans un courant de vapeur d'eau bouillante, et on dépose sur le sol un gâteau stérile, formé de millet et d'albumine cuite, en quantité assez grande pour servir à l'alimentation des jeunes poulets pendant toute la durée de l'expérience.

Il faut, en effet, on le comprend, intervenir le moins possible pendant sa durée. Le poussin éclôt, et après quelques heures d'incertitudes et de désarroi, résultant probablement pour lui d'un changement aussi complet dans la tradition, il va à l'eau et à la nourriture. Le difficile est de le protéger contre les bactéries. Il ne reçoit dans sa volière que de l'air filtré sur de la ouate, et reste toujours dans une atmosphère antiseptique. L'air qui lui arrive est d'ailleurs emprunté à la grande chambre qui l'entoure, chambre dont on a lavé tout l'intérieur avec des solutions antiseptiques, dont on a stérilisé l'air au moyen des vapeurs de formol, et dans laquelle on ne pénètre que revêtu d'une cagoule et de pantalons de fort treillis, sortant de l'étuve de stérilisation. On n'entre qu'après avoir traversé une sorte de cage, servant de vestibule,

et dont le sol est formé d'une cuvette contenant une solution de sublimé, de sorte que les chaussures elles-mêmes n'apportent aucun germe. Enfin l'atmosphère de la chambre à expérience communiquait elle-même, par l'intermédiaire de filtres d'ouate, avec celle d'un laboratoire qu'on a laissé vide pendant toute la durée des expériences, et qui était, autant qu'il est possible, en parfait repos. Une précaution nécessaire, relevée également par MM. Nuttall et Thiersfelder, est de maintenir aussi sèche que possible l'atmosphère de la chambre à expérience.

Malgré toutes ces précautions, toutes les expériences ne réussissent pas. Mais M. Schottelius en a fait plusieurs dans lesquelles non seulement les excréments du jeune poulet, mais même le poulet tout entier, peuvent être introduits dans de la gélatine nutritive sans y apporter de microbes. En collationnant ces expériences dans lesquelles la stérilité du canal digestif peut être considérée comme absolue, et en les rangeant d'après l'âge qu'avait le poussin au moment où on l'a tué pour l'étudier, on peut dresser une table de croissance des poulets élevés dans ces conditions. Les expériences faites sur 10 animaux montrent que le jeune poulet augmente à peine de poids. L'augmentation maximum est de 25 0/0 environ au bout de 12 jours, et l'absorption d'eau par le jeune poulet y est sûrement pour quelque chose. Au delà de 12 jours il y a plutôt diminution. Pendant ce temps l'augmentation des poulets élevés et nourris à la façon ordinaire est régulière, et monte au 12^e jour à 140 0/0 et au 17^e jour à 250 0/0 du poids primitif.

Il faut donc conclure que, pour le cas du jeune poulet au moins, les bactéries sont très utiles pour le travail digestif. Cette conclusion, grosse de conséquences, s'applique, comme on voit, à des aliments, millet et albumine, pour lesquels il existe normalement des diastases digestives dans le canal intestinal du jeune oiseau. Pourquoi ces diastases restent-elles inactives ? Quand on ensemence les excréments des poulets sur la gélatine, pour savoir s'ils sont stériles, on trouve que cette gélatine non seulement ne se trouble pas, mais ne se liquéfie même pas pendant les 4 à 8 premiers jours ; mais que, plus tard, les diastases contenues dans les excréments la liquéfient sans qu'on puisse y trouver trace de microbes aérobies ou anaérobies. Il semble donc, autant qu'on peut en juger par ces expériences, que la sécrétion des diastases digestives est au moins très lente pendant les premiers jours de la vie, et peut-être qu'à ce moment-là elle est très utilement remplacée par les sécrétions des microbes, qui sont toujours prêtes et abondantes.

Ce qui confirme cette idée, c'est que lorsqu'on examine les déjections des deux premiers jours, chez les poulets de contrôle nourris à façon ordinaire, on n'y trouve pas de bactéries avant 36 ou 40 heures. Or, pendant cette période, il n'y a pas augmentation de poids. Il semble

que la nutrition n'ait pas encore commencé, et le jeune animal, bien qu'ayant de l'eau à sa disposition, ne répare pas les pertes. Il se comporte comme une légumineuse dans un milieu non azoté, avant le moment où ses racines se couvrent de tubercules. Dès que les bacilles apparaissent, puis les cocci, puis les espèces acclimatées que l'on rencontre dans le canal digestif des vieilles poules, la nutrition régulière commence.

On comprend dès lors que la suppression de cette digestion microbienne pendant les premiers jours de la vie du poulet puisse être pénible ou funeste au jeune animal, très débile à ce moment. La présence des microbes dans le canal intestinal est alors utile ou nécessaire. Plus tard elle devient adjuvante; elle-même peut devenir nuisible si la fermentation prend mauvaise tournure et verse en trop grande quantité dans l'intestin des diastases ou des toxines hostiles aux tissus. En résumé, toute notre vie implique l'existence d'une symbiose avec les hôtes de notre canal intestinal, et il ne s'agit plus de leur contester leur rôle digestif; il s'agit de le mesurer et de l'élargir ou de le restreindre suivant les cas, pour le rendre hygiénique et le faire contribuer à l'entretien de la santé, tandis qu'il est maintenant l'origine soit de troubles momentanés, soit de désordres chroniques.

E. DUCLAUX.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.